

**TUUMORIN MIKROYMPÄRISTÖN (TME) VAIKUTUS SUUSYÖPÄSOLUJEN
KASVUUN JA IMUSOLMUKKEIDEN ROOLI SYÖVÄN LEVIÄMISESSÄ**

Mustonen Niko
Syventävien opintojen tutkielma
Hammaslääketieteen tiedekunta
Oulun yliopisto
Tammikuu 2020
Tuula Salo

OULUN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

Hammaslääketieteen tutkinto-ohjelma

TIIVISTELMÄ

Mustonen Niko: Tuumorin mikroympäristön (TME) vaikutus suusyöpäsolujen kasvuun ja imusolmukkeiden rooli syövän leviämisessä

Syventävien opintojen tutkielma: 37 sivua

Kirjallisuuskatsausosuudessa perehdyin suusyöpäsolujen ja tuumorin mikroympäristön (*tumor microenvironment*, TME) vuorovaikutusta käsitteleviin kansainvälisiin alkuperäis- ja katsausartikkeleihin. Tutkielmassa käsitelin myös imusolmukkeiden ja mikroympäristön roolia syöpäsolujen leviämisessä. Lähteinä käytin Pubmed, Google scholar, Science direct, Terveysportti ja Nature tietokantoja. Kokeellisessa osuudessa käsitelin kielisyöpäsolujen primaari- ja metastaasisolujen invaasiota eri matrikseihin. Eri matrikseina toimivat porsaan kaulan imusolmukkeista valmistettu Lymfogeeli, ja myooma kasvaimesta valmistettu Myogeeli. Myogeeelin eri koostumuksia olivat Myogeeli-Fibriini, Myogeeli-Growdex ja Myogeeli-kollageeni. Lisäksi yhtenä alustana käytettiin fibriiniä. Vertailuun on otettu myös kurkunpääsyövän primaari- ja metastaasisolulinjat.

Kirjallisuuden perusteella havaitsin, että TME:llä on osoitettu olevan keskeinen merkitys syöpäsolujen kasvuun. Syövän ja TME:n välisiin vuorovaikutusmekanismeihin on nykytutkimuksissa pyritty kohdistamaan lääkkeellisiä hoitoja. TME:llä on myös keskeinen rooli syöpäsolujen eloonjäämisessä, kehitymisessä, liikkumisessa ja muuttumisessa invaasiokykyisiksi maligneiksi syöpäsoluiksi. Syöpäsolujen leviämisen mahdollistavia muutoksia tapahtuu ennen varsinaisten syöpäsolujen liikkumista. Muutoksia tapahtuu syöpäsoluissa itsessään ja syöpäsolujen tulevassa metastaasipaikassa. Artikkeleista havaitsin, että imusolmukkeet luovat uusia imusuoniyhteyksiä ja niiden solut vapauttavat eri viestimolekyyliä mikroympäristöön. Eritetyt viestimolekyyliä stimuloivat imusolmukkeiden stroomaa pois homeostaasista, mikä mahdollistaa syöpäsolujen kerääntymisen alueelle. Kokeellisen osuuden tuloksista havaitsin, että erilainen TME:tä simuloiva matriksi vaikutti syöpäsolujen invaasiotaipumukseen. Invaasiokokeissa kielisyövän primaarisyöpäsolulinja invasoitui parhaiten ihmisen myoomakasvaimesta valmistettuun Myogel-Growdex:iin. Metastasoineet solulinjat invasoituivat Lymfogeeliin lähes yhtä tehokkaasti kuin Myogel-Growdexiin, Kurkunpääsyöpäsolujen invaasiota tapahtui tehokkaasti Myogel-Growdex:iin, mutta metastasoiva solulinja invasoitui myös Myogel-Collagen matriksiin. Muissa alustoissa (Fibrin, Myogel-Fibrin) ei juurikaan tapahtunut invaasiota.

TME:n komponenttien ja syöpäsolujen vuorovaikutukseen on syytä kohdistaa lisätutkimuksia parempien hoitovaihtoehtojen löytämiseksi. Syöpäsolujen käyttäytymistä on haastavaa tutkia *in vivo*, joten TME:tä simuloivan matriksin käyttö on perusteltua. TME:n tuntemuksella voidaan luoda todenmukaisia matrikseja *in vitro* tutkimuksiin, josta voidaan saada sovelluksia esimerkiksi henkilökohtaiseen lääkekehitykseen.

Avainsanat: OSCC, TME, Invaasio, Imusolmuke, Lymfogeeli

SISÄLLYSLUETTELO

SISÄLLYSLUETTELO.....	3
1 JOHDANTO	5
2 SUUONTELON LEVYEPITEELIKARSINOOMASTA	6
2.1 Hoito ja seulonta.....	7
3 SYÖPÄSOLUJEN ETIOLOGIA JA SYÖVÄN MIKROYMPÄRISTÖ	7
3.1 Syöpäsolun etiologia	7
3.2 Tuumorin mikroympäristö (TME)	8
3.3 TME:n komponentit	9
4 TME:SSA TAPAHTUVAT MUUTOKSET SYÖPÄSOLUJEN KASVUSSA.....	11
4.1 Proliferaatiosignaali.....	11
4.2 Solusykliä säätelevät tekijät	12
4.3 Apoptoosin välttäminen	13
4.4 Angiogeneesin säätely.....	14
4.5 Kemokiinit.....	16
4.6 Immuunipuolustuksen rooli syövän progressiossa.....	17
4.7 Tulehduksen, immuunipuolustuksen ja TME:n välinen vuorovaikutus.....	17
5 SYÖPÄSOLUJEN LEVIÄMINEN	19
5.1 Invaasiokykyyn liittyvät muutokset syöpäsoluissa	19
5.2 Invaasion ja metastasoinnin indusointi.....	21
5.3 Premetastaattinen paikka (<i>premetastatic niche</i>)	22
6 IMUSOLMUKKEIDEN MERKITYS SYÖPÄSOLUJEN LEVIÄMISESSÄ	23
6.1 Rakenteet	24
6.2 Invaasion mahdollistavia muutoksia imusolmukkeissa	24
7 KOKEELLINEN OSUUS.....	26
7.1 Tutkimuksen menetelmät	26

7.1.1	Lymfogeelin valmistus ja muut käytetyt geelit.....	26
7.1.2	Solujen invaasiokokeet	27
7.2	Tulokset.....	28
8	POHDINTA	29
9	LÄHTEET.....	31

1 JOHDANTO

Suusyövällä tarkoitetaan yleisimmin kielessä, suunpohjassa tai ikenissä esiintyvää karsinoomakasvainta. Suusyövän ennuste on verrattain huono, sillä 5 vuoden eloonjäämisennuste on keskimäärin vain vähän yli puolet. Suun alueen syövät ovat yleistyneet Suomessa sekä maailmanlaajuisesti. Tärkeimpiä riskitekijöitä suusyövälle ovat alkoholi, tupakointi, HPV-infektio sekä suusyöpävaaraa lisäävät limakalvomuutokset. Suusyöpä on alkuvaiheessa lähes oireeton, mutta se lähettää jo varhain etäpesäkkeitä. Suusyövän varhainen diagnosointi on eloonjäämisennusteen kannalta erittäin tärkeää. Vaikka suusyövälle altistavia tekijöitä tunnetaan useita, syöpäsolujen solutason mekanismit ovat vasta viime vuosina olleet tarkemman tutkimuksen alla.

Syövän mikroympäristö rakentuu lukuisista eri soluista ja ekstrasellulaarimatriksista. Malignien syöpäsolujen kasvua tukevat ei-malignit solut ja kudusrakenteet lasketaan kuuluvan nk. tuumorin mikroympäristöön (*tumor microenvironment*, TME). Ei-malignit solut tukevat usein malignien solujen karsinogeenisiä lisäten niiden kasvua ja kehitystä. TME:n soluja ovat esimerkiksi fibroblastit, vaskulaariset ja lymfaattiset endoteelisolut, perisyytit sekä immuunipuolustuksen solut. Syöpäsolut saavat TME:stä kontrolloimattomaan kasvuunsa tarvittavat viestinsä erilaisten sytokiinien, kemokiinien, kasvutekijöiden ja entsyymien välityksellä. Invaasio ja metastasoituminen saavat myös alkunsa mikroympäristön signaaleista. TME:n karsinogeneesiin vaikuttavat muutokset ovat laaja kirjo eri solujen ja komponenttien vuorovaikutuksia, eikä voida todeta syöpäsolujen kehittymisen olevan vain yhden tekijän ansiota. Syövän kehittyminen on usean eri tekijän summa, joista seuraa syöpäsoluille proliferatiivinen TME.

TME:n muutokset ovat edellytys syövän kasvuille. Esimerkiksi angiogeneesiä kiihdyttäviä tapahtumia on havaittu ekstrasellulaarimatriksin molekyyleissä, fibroblasteissa sekä immuunisoluissa. Lisäämällä angiogeneesiä syöpäsolut saavat lisää ravintoa ja reitin muualle elimistöön. Angiogeneesiin vaikuttavat kemokiinit, kasvutekijät ja proteaasit vaikuttavat osaltaan mikroympäristön muutoksiin ja sitä kautta syövän kasvuun sekä leviämiseen.

Syöpäsolut kohdistavat myös itseensä muokkausta pyrkiessään leviämään muihin kudoksiin. TME:n muutokset ovat suuressa roolissa syövän kasvussa, sekä metastasoinnissa. TME:tä ja sen muutoksia tutkimalla voidaan saada uutta tietoa syövän kehittymisestä ja leviämisestä sekä kehittää syvempää ymmärrystä mikroympäristön muutosten syistä. Tämän tutkielman tarkoitus on perehtyä kirjallisuuskatsauksen avulla syöpäsolujen TME:tä käsittelevään kirjallisuuteen ja tarkastella pääpiirteisesti millaisia muutoksia TME:n eri komponenteissa tapahtuu, kun syöpäsolut kehittyvät invaasiokykyisiksi soluiksi. Kirjallisuuskatsauksessa pyrin käsittelemään TME:n muutoksia

erityisesti suun levyepiteelikarsinooman kannalta. Kokeellisessa osuudessa käsittelen kielisyöpä- ja kurkunpääsyöpäsolujen invaasiota eri matrikseihin.

2 SUUONTELON LEVYEPITEELIKARSINOOMASTA

Suun levyepiteelikarsinooman ilmaantuvuus on ollut kasvussa. Suusyövän 5 vuoden eloonjäämisennuste on miehillä 61% ja naisilla 67%. Ennustetta parantavat varhainen diagnoosi ja syövälle altistavien riskien vähentäminen. (Suusyöpä: Käypä hoito -suositus 2019) Kielisyövän ennusteen on osoitettu parantuneen Suomessa. Mroueh ym analysoivat kaikkien suomalaisten yliopistosairaaloiden kielisyöpäpotilaat vuosilta 2005-2009. Yhteensä 328:aan potilaalle annettiin parantumiseen tähtäävää hoitoa. Kielisyövän 5-vuotisennuste riippui syövänvaiheesta: alkuvaiheen syövässä (*Stage I*) elossa oli seuranta-ajan loputtua 87 %, *Stage II* potilaista 73%, ja *Stage III* 69% ja *Stage IV* 51%. 5-vuotisseurannassa osoitettiin myös, että 65%:lla syöpä ei uusiutunut, kun aikaisemmasta vuosilta 1995-1999 tehdystä ennusteesta uusiutumattomina pysyviä syöpiä oli 47%. Tutkimuksessa todettiin kielisyövän ennusteen parantuneen viime vuosina Suomessa. (Mroueh ym. 2017)

Suusyövän riskitekijöinä pidetään yleisesti alkoholi- ja tupakkatuotteiden käyttöä. Pitkään tupakoinneilla ja alkoholia säännöllisesti nauttivilla on osoitettu selkeästi kohonnut riski suusyövän kehittymiseen. Ruokavalion on myös havaittu vaikuttavan syöpäriskiin. Runsaasti karotenoideja sisältävillä kasviksilla on havaittu suusyöpää suojaavia vaikutuksia, kun taas grillattujen ja savustettujen lihojen säännöllinen nauttiminen lisää syöpäriskiä. (Franco ym. 1989) Yli 25% alkoholia sisältävien suuvesien käyttö, HPV-infektio ja suun syöpävaaraa lisäävät limakalvomuutokset lisäävät suusyövän riskiä. (Suusyöpä: Käypä hoito -suositus 2019)

Limakalvomuutoksia, joilla epäillään olevan yhteys kohonneeseen syöpäriskiin, ovat esimerkiksi leukoplakia, erytroplakia, submukoottinen fibroosi, lichen planus ja muut limakalvoilla havaittavat muutokset. (Warnakulasuriya ym. 2007) Limakalvomuutoksia voi olla toisinaan vaikea tunnistaa, ja usein muutos liittyy useaan eri häiriöön tai sairauteen. Varsinkin kielisyövän on havaittu lisääntyneen maailmanlaajuisesti, etenkin myös nuorilla, jotka eivät kuulu tyypilliseen riskiryhmään. Tutkimuksessa, jossa analysoitiin 22:n eri maan syöpärekistereitä, osoitettiin että uusien kielisyöpätapausten ilmaantuvuus oli kasvussa entistä nuoremmilla potilailla. Tutkimuksessa 14:ssä rekisterissä alle 45-vuotiaiden kielisyövän ilmaantuvuus oli korkeampi kuin yli 45-vuotiailla. Yhtä selkeää syytä ilmaantuvuuden lisääntymiseen ei rekisterien perusteella pystytty osoittamaan. (Ng ym. 2017)

2.1 Hoito ja seulonta

Suusyövän tärkeimpinä hoitomuotoina ovat leikkaus sekä leikkauksen ja sädehoidon yhdistelmä. (Suusyöpä: Käypä hoito -suositus 2019) Intialaisessa tutkimuksessa todettiin, että riskiryhmille suunnatuilla väestöpohjaisilla seulontatutkimuksilla voitiin vähentää suusyöpään kuolleisuutta. (Sankaranarayanan ym. 2013) Eri väestöpohjissa esiintyy erilaisia riskitekijöitä, jotka altistavat suusyövälle. Riskiryhmien seulontatutkimuksien on havaittu vähentävän kuolleisuutta myös eri väestöpohjissa. Tulokset tukevat kaikille riskiryhmille suunnattuja seulontatutkimuksia, joilla suusyövän kuolleisuutta voitaisiin vähentää (Chuang ym. 2017) Seulontatutkimuksissa suun limakalvot tarkastetaan ammattilaisten toimesta säännöllisin väliajoin, jolloin mahdolliset malignit muutokset pystytään diagnosoimaan aikaisin, mikä mahdollistaa aikaisen intervention ja parantaa huomattavasti hoitoennustetta. Suomessa ei ole käytössä riskiryhmien seulontaa, mutta limakalvojen tarkastus suoritetaan normaalin hammastarkastuksen yhteydessä. (Suusyöpä: Käypä hoito -suositus 2019)

Suun levyepiteelikarsinooman (*oral squamous cell carcinoma* OSCC) ennaltaehkäisy voidaan jakaa primaari-, sekundaari- ja tertiaaripreventiovaiheisiin. Primaaripreventiossa syövän kehittymistä pyritään ehkäisemään vähentämällä riskitekijöitä ja ohjaamalla käyttäytymistä terveyttä edistäväksi. Sekundaaripreventiossa OSCC pyritään havaitsemaan aikaisin, ja muutoksiin reagoimaan nopeasti. Aikaisella hoidolla potilas saadaan usein parannettua ja kuolleisuus pidettyä alhaisena. Tertiaaripreventiossa syövän uusiutumista pyritään välttämään ja pitämään hoitoon sekä sairauteen liittyvät komplikaatiot mahdollisimman pieninä. (Thomson 2018). On tärkeää tuntea syöpäsolujen kasvun, leviämisen ja kuoleman solutason mekanismit, jotta varhainen diagnoosi ja hoito ovat mahdollisia.

3 SYÖPÄSOLUJEN ETIOLOGIA JA SYÖVÄN MIKROYMPÄRISTÖ

3.1 Syöpäsolun etiologia

Solun jakaantuminen (proliferaatio) ja kuolema (apoptoosi) ovat tarkkaan säädeltyjä prosesseja, johon osallistuu runsas joukko geenejä. Geenit voivat toimia solun kannalta kasvua hidastavina (suppressoivina) tai kasvua edistävinä (induktiivisinä). Useimmissa syöpäsoluissa on havaittu yli 60 geenimutaatiota kasvun säätelygeeneissä, jotka ovat johtaneet siihen, että syöpäsolun kasvu ei ole enää kontrollissa, ja syöpäsolut eivät enää vastaa kaikkiin säätelysignaaleihin. (Nguyen ym. 2009). Solun jakautumista ja kasvua säätelevät proto-onkogeenit, jotka ovat tärkeitä solun normaalille toiminnalle. Mutaatio proto-onkogeenissä voi muuttaa sen onkogeeniksi, eli syöpägeeniksi.

Onkogeeneihin johtava mutaatio vaatii usean peräkkäisen mutaation, mistä johtuu, että syöpä yleistyy iän myötä mutaatioiden kumuloituessa. (Knudson 2001) Normaalisti solut jakautuvat solusyklin säätelemänä. Solusykli on tarkkaan hallittu mekanismi, jolla tuotetaan kaksi identtistä tytärsolua alkuperäisestä solusta. Syöpäsolujen solusykliä säätelevät geenit ovat usein vaurioituneet, mikä johtaa hallitsemattomaan kasvuun ja jakautumiseen. (Sherr 1996)

Suusyövän kehittymistä edeltää normaalin solusyklin häiriintyminen ja poikkeuksellinen proliferaatio. *In vitro* on havaittu, että merkittävästi lisääntynyt proliferaatio epiteelisoluissa indikoi vakavan dysplasian kehittymistä ja OSCC:n pahenemista. Suusyöpä esiintyy tyypillisesti tietyillä limakalvoalueilla, ja onkin syytä epäillä, että tyypilliset syöpäalueet ovat alttiimpia pahanlaatuisille muutoksille kuin muut ympäröivät kudokset. Riskialueen soluissa on havaittu esiintyvän enemmän proliferaatiota, kuin alueilla, joissa syöpää ei tyypillisesti esiinny. Thomson ym mittasivat tutkimuksessaan eri suun alueiden kudoksenäytteistä solujen solusyklin pituutta ja solujen jakaantumista. Vertailussa havaittiin, että riskialueella esiintyi soluissa pidentynyt solusyklin s-vaihe. Matalan riskin alueen epiteelisolujen proliferaatiota tapahtui myös vähemmän kuin riskialueen soluissa. Riskialueen solut oli kerätty kielen tyvestä ja suun pohjasta. Matalan riskin solut puolestaan olivat peräisin kitalaesta. (Thomson ym. 1999)

3.2 Tuumorin mikroympäristö (TME)

Syövän kehittyminen ja proliferaatio ovat monimutkainen tapahtuma, johon vaikuttavat syöpäsolujen lisäksi myös ympäröivien solujen ja kudoksien sekä liukoisten molekyylien toiminta. Ympäröiviä rakenteita tutkimalla voidaan ymmärtää paremmin syöpäsolujen käytöstä ja kohdentaa tarkempia hoitomuotoja estämään syövän leviämistä. Syöpäsolujen kasvun säätely tapahtuu solujen itse tuottamien signaalien tai ympäröivien solujen signaalien vaikutuksesta. Syöpäsolut muodostavat ympärilleen mikroympäristön, joka on eduksi niiden kasvuun ja kehitykselle. Syövän mikroympäristö (TME- *tumor microenvironment*) sisältää syöpäsolujen lisäksi useita strooman soluja ja elimistön normaaleja soluja, jotka tuottavat yhdessä suuren joukon syöpäsolujen kasvua tukevia säätelytekijöitä. (Quail & Joyce 2013)

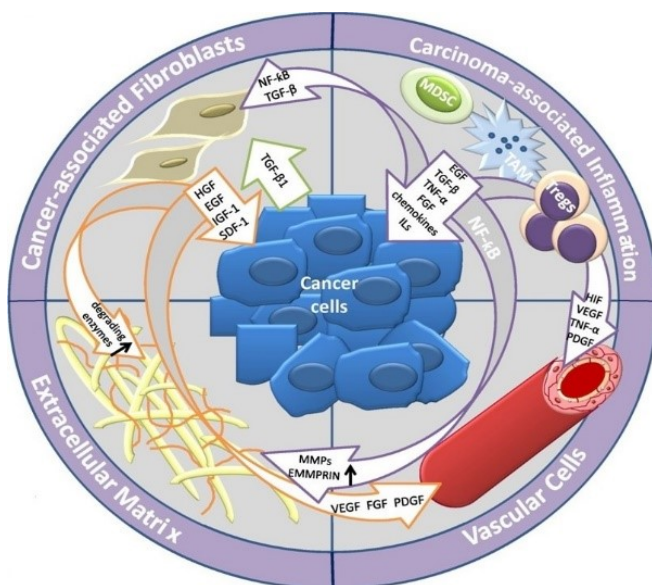
Syöpäsolujen TME eroaa normaalista fysiologisesta mikroympäristöstä. TME:ssä ekstrasellulaarimatriksin molekyylien funktiot ovat muuttuneet, veri- ja imusuoniverkosto on normaalista poikkeavaa, solujen sekä joidenkin makrofagien fenotyyppi on muuttunut. TME:ssä on myös normaalista poikkeavia fysiologisia tiloja, kuten hypoksiaa, pH:n vaihtelua ja nestetilojen

muutoksia. Koska TME:ssä solut ovat geneettisesti vakaampia kuin syöpäsolut, sen muutokseen puuttuminen on vaikuttanut lupaavalta syöpäkasvaimen hoitomuodolta. (Quail & Joyce 2013) Syöpäsolujen toiminnan seurauksena myös stroomassa tapahtuu useita muutoksia, jotka johtavat homeostaasin järkkymiseen ja syöpäsoluille edulliseen kasvuympäristöön.

3.3 TME:n komponentit

TME koostuu mm. fibroblasteista, adiposyyteistä, perisyhteistä, tulehdussoluista, mesenkymaalisista kantasoluista, veri- ja imusuoniverkostosta, sekä ekstrasellulaarimatriksista, proteaaseista, sytokiineista ja kasvutekijöistä (Balkwill ym. 2012, Chen ym. 2015) Seuraavaksi esittelen lyhyesti mikroympäristöstä tyypillisesti löytyviä soluja ja kerron niiden merkityksestä syövän kasvulle.

Syöpään assosioituvat fibroblastit (CAF-*carcinoma associated fibroblasts*) muodostuvat eri teorioiden mukaan useista eri elimistön soluista. CAF muodostumista arvellaan tapahtuvan paikallisista fibroblasteista, jotka uudelleenohjelmoidaan syöpään assosioituviksi mikro-RNA:n välityksellä. CAF muodostumista tapahtuu myös adiposyyteistä, kasvaimen epiteelisoluista, endoteelisoluista, luuytimen mesenkymaalisista kantasoluista ja hematopoieettisista kantasoluista. (Balkwill ym. 2012, Mitra ym. 2012, Shiga ym. 2015). CAF invaasiota indusoivia vaikutuksia on esitetty kuvassa 1. (T. Salo ym. 2014)



Kuva 1 Mikroympäristön komponentit ovat vuorovaikutuksessa keskenään sytokiiniin ja muiden viestimolekyylien välityksellä. CAF lisäävät muun muassa syöpäsolujen invaasiokykyä.

CAF-solut tuottavat sytokiineja, kasvutekijöitä ja kykenevät muokkaamaan ekstrasellulaarimatriksia. Ne kykenevät myös edistämään syöpäsolujen proliferaatiota, invaasiota, metastaasia ja angiogeneesiä. Eräs CAF:ien tärkeistä sytokiineista on interleukiini-6 (IL-6), joka toimii keskeisessä roolissa tulehdus- ja immuunivasteen säätelyssä, syövän proliferaatiossa, migraatiossa ja angiogeneesissä. IL-6 vaikuttamalla on voitu supressoida angiogeneesiä ja vähentää syöpäsolujen sekä strooman vuorovaikutusta. (Shiga ym. 2015). CAF:lla on esitetty olevan yhteys syövän ennusteeseen. Meta-analyysissä, jossa tarkasteltiin CAF:ien vaikutusta OSCC potilaiden prognoosiin, havaittiin strooman korkeiden CAF-pitoisuuksien heikentävän syöpäpotilaiden ennustetta. Korkeaa CAF-pitoisuutta esiintyi OSCC potilailla, joilla syövän invasoituminen oli edennyt, TNM-luokitus oli pahentunut, invaasiosyvyys kasvanut, sekä prognoosi kauttaaltaan huonontunut. TNM-luokitus (*Tumour node metastasis*) kertoo syövän levinneisyysasteen. TNM-luokitus tapahtuu kasvaimen koon ja levinneisyyden mukaan. Dourado ym. totesivat katsauksessaan CAF:ien indikoivan huonoa prognoosia OSCC potilailla. (Dourado ym. 2018)

Kasvaimeen liittyvät makrofagit (TAM- *tumour associated macrophages*) edistävät syöpäsolujen kasvua ja angiogeneesiä. TAM kerääntyvät TME:n alueille, joissa esiintyy hypoksiaa tai nekroosia. OSCC potilasnäytteissä on havaittu esiintyvän eri markkereita sisältäviä TAM:ja, jotka liittyivät suusyövän prognoosiin. TAM:ien eri markkerit, kuten CD68 ja CD163, korreloivat syövän imusolmukkeisiin leviämisen kanssa. Korkea CD68- ja CD163-markkeripitoisuus vaikutti ennustavan syöpäpotilaan huonompaa ennustetta. (Balkwill ym. 2012, He ym. 2014) He ym arvioivatkin TAM-markkerien sopivan suusyöpäpotilaiden prognoosin arvioimiseen.

T-lymfosyyttejä löytyy syöpäsolujen joukosta ja ympäriltä. T-lymfosyyttien fenotyyppi vaikuttaa syövän käytökseen ja CD8+ sekä CD4+ fenotyyppien esiintyminen syöpäkudoksessa liittyy usein hyvään prognoosiin. (Balkwill ym. 2012, Fridman ym. 2012) B-solujen infiltraatio syöpäkudokseen liittyy myös usein hyvään prognoosiin, vaikka joissain hiirikokeissa B-solut edistivät syövän kasvua. (Balkwill ym. 2012). TME:ssä dendriittisolut toimivat viallisesti eivätkä stimuloi syöpäsolujen antigeenejä tunnistavaa immuunivastetta. Tulehduksellinen ja hypoksinen TME heikentää entisestään viallisesti toimivia dendriittisoluja ja suppressoivat sitä kautta T-soluvastetta. (Balkwill ym. 2012) Myeloidien säätelysolut (MDSC- *myeloid derived suppressor cell*) ovat inhibitorisia immuunisoluja, joita esiintyy paljon syövässä. MDSC inhiboivat CD8+ T-solujen aktivaatiota ja lisäävät TAM polarisaatiota. (Balkwill ym. 2012)

Joissakin syövässä TME:n rasvasolut eli adiposyytit, toimivat syöpäsolujen eduksi. Adiposyytit voivat erittää adipokiineja, jotka auttavat malignien solujen rekrytoimisessa. Syöpäsolut saavat adiposyyteistä myös rasvahappoja käyttöönsä, joiden avulla ne pystyvät kasvamaan tehokkaammin.

(Nieman ym. 2011) Perisytyt ovat monikykyisiä heterogeenisiä soluja, jotka muun muassa tukevat verisuonten rakenteita. Perisytytien vähäisen määrän verisuonissa epäillään korreloivan huonon prognoosin ja lisääntyneen metastaasiaktiivisuuden kanssa. Perisytytien väheneminen on yhdistetty lisääntyneeseen hypoksiaan, syöpäsolujen muokkaukseen ja MET (*Mesenchymal to epithelial transition*) –reseptorin aktiivisuuteen. (Cooke ym. 2012) Syöpäsolujen fenotyypin muutoksia, kuten MET-kaltaiset muutokset, käsitellään myöhemmissä kappaleissa.

ECM on TME:n laajin osa ja se sisältää monia eri solujen erittämiä molekyylejä. ECM koostuu joukosta solunulkoisia molekyylejä, kuten proteoglykaaneista, kollageeneista, elastiinista sekä muista proteiineista. ECM:n tärkeimpiä tehtäviä on kudosten kehittymisen säätely, solujen suojaaminen ja homeostaasin ylläpito. ECM:n molekyylit vaikuttavat solujen kasvuun, selviytymiseen, liikkumiseen, lisääntymiseen ja erilaistumiseen. Erilaatuisten syöpien edetessä, niissä kehittyä omanlaisensa mikroympäristö sekä ECM, mikä toimii kyseisen syövän kannalta proliferatiivisesti. (Pickup ym. 2014)

Useassa syöpähoidossa on pyritty vaikuttamaan TME:n muutoksiin ja sitä kautta saada tilanne mikroympäristön alueella normalisoitua. Lupaavia hoitotuloksia on saavutettu hoidoilla, joiden kohteena on esimerkiksi ollut vaskulaariset muutokset, syöpään assosioituva tulehdus, syöpäsolujen ja TME:n viestintään puuttuminen sekä TME:n hypoksiaan vaikuttaminen. (Fang & Declerck 2013)

4 TME:SSA TAPAHTUVAT MUUTOKSET SYÖPÄSOLUJEN KASVUSSA

Syöpäsolut ja niiden mikroympäristö ovat kompleksinen kokonaisuus, jossa eri sytokiinien, kasvutekijöiden, proteaasien ja rakennemolekyylien sekä solujen välinen viestintä ohjaa syöpäsolujen lisäksi myös isäntäsolujen käytöstä ja vuorovaikutusta syöpäsolujen kanssa. Syöpähoitojen tehokkaan kohdentamisen vuoksi on olennaista tuntea tämän vuorovaikutuksen mekanismeja. Seuraavaksi käsitellään syöpäsolujen ja TME:n vuorovaikutuksia proliferaation, angiogeneesin, kasvutekijöiden suppression, invaasion ja immunosuppression osalta.

4.1 Proliferaatiosignaali

Normaalit solut säätelevät tarkasti kasvuaan ja jakaantumistaan. Kun solu muuttuu syöpäsoluksi alkaa siinä esiintyä säätelemättömiä signaalikaskadeja, jotka mahdollistavat syöpäsolun irtaantumisen normaalisolujen tarvitsemista proliferaatiosignaaleista. Yksinkertaistettuna normaali solujen solusykli koostuu neljästä vaiheesta: G1, S, G2 ja M. Neljän vaiheen lisäksi on olemassa lepovaihe G0, jossa esimerkiksi hermosolut käytännössä lakkaavat jakaantumisesta. Solujen mikroympäristön muutokset vaikuttavat solujen päätökseen siirtyä solusyklin eri vaiheisiin. Solun proliferaatiota

säädellään pääasiassa G1 vaiheessa. G1 vaihetta säätelevät retinoblastooma (Rb)-proteiiniperheen signaalikaskadit, jotka aktivoivat S vaiheeseen tarvittavat transkriptiotekijät. Normaalisti toimiva solu tarvitsee signaalin mikroympäristöstä voidakseen siirtyä seuraavaan solusyklin vaiheeseen; signaali voi olla esimerkiksi kasvutekijä. (Duronio & Xiong 2013)

Normaalista solusta poiketen syöpäsolu ei välttämättä tarvitse ulkoista ärsykettä pitääkseen yllä jatkuvaa proliferaatiivista signaalia. Syöpäsolut voivat saavuttaa omavaraisuuden proliferaatiosignaaleista. Solut voivat tuottaa omaa kasvutekijäänsä ja niiden reseptoreita, jolloin ne voivat autokriinisesti tuottaa itselleen proliferaatiosignaalia. Syöpäsolut voivat myös tuottaa parakriinisiä signaaleja stimuloidakseen normaaleja soluja tuottamaan syöpäsolun tarvitsemia kasvutekijöitä. Syöpäsolu voi muuttua myös hypersensitiiviseksi ja reagoida normaalisti liian pieneen määrään proliferaatiosignaalia. Syöpäsolu voi myös kokonaan irtaantua ulkoisista kasvutekijäsignaaleista, mikäli jokin muu signaalikaskadi on aktivoitu tai syöpäsolu on kehittänyt nk. *negatiivisen feedback* - mekanismin (Hannahan ym. 2000)

4.2 Solusykliä säätelevät tekijät

Varmistaakseen kasvunsa syöpäsolujen tulee poistaa sen kasvua rajoittavat tekijät. Tunnetuimmat kasvun estäjät ovat retinoblastooma- ja TP53-proteiinit. (Hanahan & Weinberg 2011) Retinoblastooma-proteiinit (Rb) käynnistää hallitun ja ajoitetun transkription. Rb-proteiinit toimivat solun ulkoisten ja solun sisäisten signaalien mukaan, ja vasteena signaaleille aloittavat solusyklin jakaantumisvaiheen. Rb-proteiini inhiboi solusykliä estämällä transkriptiotekijä-E2F:n toimintaa. Rb:n inaktivoituminen liittyy sen fosforylaatioon. Inaktivoitunut Rb ei enää rajoita solusykliä ja se voi johtaa hallitsemattomaan jakaantumiseen (Weinberg 1995) Rb tason lisääntymistä havaittiin myös pahanlaatuisemmissa syövässä, minkä oletettiin viittaavan Rb:n rooliin syövän etenemisessä. (Thomas ym. 2015)

P53 on tunnettu kasvua rajoittava proteiini. Kun solu havaitsee DNA-vaurion, p53 kerääntyy solun tumaan fosforylaation ja asetylaation avulla. Muokkaus muuttaa p53:n aktiiviseksi, ja p53 aktivoi kohdegeeninsä tuottamaan apoptoosiin tai solusyklin keskeytykseen tarvittavat proteiinit. Virheet tai mutaatiot p53-geenissä on osoitettu olevan kytköksissä useaan eri syöpään: arviolta yli 50 % syövästä esiintyy siinä mutaatio. Virheellinen p53 geeni ei pysäytä virheellistä DNA:ta sisältävän syöpäsolun jakaantumista, jolloin mutatoitunut solu jakaantuu jakaen geenivirheensä tytärsoluille. (Ozaki & Nakagawara 2011)

4.3 Apoptoosin välttäminen

Apoptoosin avulla vanhat solut kuolevat, ja kudosten homeostaasi säilyy. Apoptoosi voi käynnistyä myös puolustusreaktiona sairaita tai infektoituneita soluja kohtaan. Apoptoosiin johtava signaalikaskadi voi aktivoitua joko sisäisten tai ulkoisten signaalien seurauksena. Signaalin saatuaan mitokondrioiden ulkoinen membraani muuttuu läpäisevämmäksi, ja solulimaan vapautuu sytokromi C-entsyymiä, joka aktivoi kaspasii-proteaaseja. Kaspasit aktivoivat prosesseja, jotka alkavat tuhota solua. Ulkoinen apoptoosikäskey voi olla seuraus muiden solujen lähettämistä apoptoosiligandeista. Ligandi kiinnittyy solukalvolla olevaan reseptoriin muodostaen kompleksin, joka lopulta johtaa kaskadiaktivaatioon ja edelleen apoptoosiin. (Elmore 2007)

Syöpäsolut ovat irtaantuneet normaalista solusyklistä, ja niissä ei tapahdu normaaliin tahtiin apoptoottista solukuolemaa. Liian vähäinen apoptoosi johtaa siihen, että syöpäsolujen määrä kasvaa hallitsemattomasti. Apoptoosin välttämistä voidaan pitää syöpäsolujen kannalta välttämättömänä muutoksena niiden elinvoimaisuuden kannalta. (Hanahan & Weinberg 2000)

Apoptoosiin osallistuu suuri joukko pro- ja antiapoptoottisia proteiineja, joiden tasapainoa häiritsemällä syöpäsolut voivat estää apoptoosinsa. Bcl-2 perheen proteiinit sijaitsevat mitokondrion ulkokalvolla, ja säätelevät kalvon läpäisevyyttä ionikanavien ja aukkojen avulla. Bcl-2 proteiiniperheessä on apoptoosia vastustavia ja edistäviä proteiineja. (Gross ym. 1999) Apoptoosia vastustavien proteiinien indusointi tai proapoptoottisten proteiinien inhibointi suojelee syöpäsoluja apoptoosilta. (Wong 2011)

Apoptoosia inhiboivat proteiinit ovat joukko proteiineja, jotka voivat häiritä apoptoosia inhiboimalla kaspaseja. Inhiboivat proteiinit voivat häiritä kaspaseja kiinnittymällä aktiiviseen kohtaan tai estämällä niiden pääsyn substraattinsa luokse. Eri kaspasit ovat vähentyneet eri syövässä. (Wong 2011) Kaspasien aktivaation vaikutuksesta syöpähoitojen tehokkuuteen on jonkin verran näyttöä. (Hensley ym. 2013) Yksittäisillä kaspasii-inaktivaatioilla ei uskota olevan suurta merkitystä karsinogeneesissä, mutta kaspasien yhteisvaikutus voi vaikuttaa karsinogeneesiin merkittävästi. (Olsson & Zhivotovsky 2011) Kaspasien normaalin toiminnan takaaminen voi heikentää syöpäsolujen toimintaa, ja sitä kautta luoda pohjaa uusille syöpähoidoille. Solut voivat saada apoptoosikäskeyn solukalvon reseptorin ja sen ligandin muodostamasta kompleksista. Kompleksin häiritseminen johtaa solun ulkoisen apoptoosikäskeyn häiriintymiseen, ja tätä mekanismia usean syövän tiedetään käytettävän. Syöpäsolut voivat vähentää apoptoosireseptorin ekspressiota tai ekspressoita pinnallaan valereseptoria, jonka kompleksi ei johda kaspasien vapautumiseen. (Wong 2011)

TME:n on osoitettu vahvistavan syöpäsolujen neoplastisia ominaisuuksia. Syöpää ympäröivien solujen vapauttamat sytokiinit lisäävät immuunipuolustusta vähentäviä soluja, syövän etenemistä ja lääkeresistenssiä. TME komponentteja, jotka vaikuttavat apoptoosin normaaliin toimintaan, ovat endoteelisolut, fibroblastit, mesenkymaaliset solut ja adiposyytit. Syöpäsolut tuottavat kasvutekijöitä kuten VEGF-A:ta, joka stimuloi endoteelisolujen proliferaatiota ja erilaistumista. Endoteelisolujen stimulointi indusoi verisuoniyhteyksiä kasvainalueelle, ja syövän ravinnon saanti paranee. Fibroblastit puolestaan erittävät interleukiini-6 -sytokiinia, joka aktivoi anti-apoptoottista Bcl-perheen proteiinien ekspressiota. Myös adiposyytit voivat stimuloida anti-apoptoottisten proteiinien, kuten Pim-2 ja Bcl-2, tuotantoa. Karsinoomaan liittyvät mesenkymaaliset kantasolut voivat muodostaa hypoksia lokeraita erittämällä hypoksiaa indusoivaa tekijää HIF-1 α . Hypoksiset alueet korreloivat syöpäsolujen selviytymisen ja kemoresistiivisyyden kanssa. Syöpähoitoja suunniteltaessa tulisi ottaa huomioon kaikkien signaalimolekyylien väliset kytkökset, jotta hoito olisi mahdollisimman tehokasta. (Yaacoub ym. 2016) Käytännössä kaikkien kytkösten tunteminen on kuitenkin hyvin haastavaa.

4.4 Angiogeneenin säätely

Angiogeneesiä säätelevät erilaiset aktivaattorit ja inhibiittorit. Angiogeneesiä lisääviä aktivaattoreita ovat kasvutekijät, kuten VEGF, FGF, PDGF ja EGF. Inhibiittoreina voivat toimia muun muassa angiostatiini, endostatiini, canstatiini ja thrombospondin-1. Angiogeneenisten tekijöiden välillä vallitsee tasapaino, jolloin angiogeneesi ei käynnisty; tasapainon järkyttyä se voi käynnistyä. Tasapainotilan järkkyminen tunnetaan nimellä *angiogenic switch*, ja se on edellytys syövän kasvu. Ilman tätä syöpäkasvain ei saavuta eksponentiaalisen kasvun vaihetta, koska se ei saa tarpeeksi ravintoa. Angiogeneenin käynnistymistä seuraa syöpäsolujen perivaskulaarinen kiinnittyminen ja verisuonten laajentuminen. Seuraavaksi verisuonet kuroutuvat muodostaen uusia verisuonia. Verisuonten muodostuminen jatkuu kaoottisesti ilman interventiota ja syöpäsolut saavat lopulta turvattua ravinnon saantinsa. (Bergers & Benjamin 2003)

Syöpäkuksella on kyky indusoida angiogeneesiä. Angiogeneenin induktio voi tapahtua syöpäonkogeneenien avulla tai epäsuorasti immuunipuolustuksen solujen avulla. Syövän edetessä on usein havaittavissa angiogeneenin pysyvä aktivoituminen. Aktiivinen angiogeneesi saa uinuvan verisuoniston haarautumisen tuottamaan uusia verisuoniyhteyksiä syöpäsolujen käyttöön. (Hanahan & Weinberg 2011) Angiogeneenin aktivoitumiseen vaikuttaa syöpäsolujen ja TME:n tuottamien pro- ja antiangiogeneenisten tekijöiden tasapaino. Tasapainon järkkyyessä proangiogeneenisten tekijöiden puolelle angiogeneesi voi käynnistyä. Antiangiogeneettisten tekijöiden ylituotanto puolestaan

vähentää angiogeneesiä, tai lopettaa sen kokonaan. VEGF-A on pro-angiogeeninen tekijä, joka säätelee fysiologista ja patologista angiogeneesiä. VEGF-A sitoo kaksi reseptoria, jotka sijaitsevat verisuonten endoteelisoluissa. VEGF-A lisää reseptoreiden kautta angiogeneesiä alkionkehityksen ja haavojen parantumisen aikana. Saavutettu normaali angiogeneesi on hallittua ja verisuonet muodostuvat selkeinä ja säännöllisinä. Syöpäsolujen tuottama VEGF-A sitoutuu niin ikään endoteelisolujen reseptoreihin, mutta muodostuneet verisuonet ovat epäsäännöllisiä kooltaan ja muodoltaan. Epäsäännölliset verisuonet aiheuttavat vuotoa ja korkeaa painetta, joka johtaa hypoksian syntymiseen ja lisääntyneeseen VEGF-A tuotantoon. (Carmeliet 2005)

Hypoksia-alueet syövän mikroympäristössä ovat hyvin tyypillisiä. Hypoksia stimuloi viestisignaali-verkostoa syöpäsoluissa. Hypoksia ja siihen liittyvät transkriptiotekijät, kuten esimerkiksi HIF-1 α , ovat yhteydessä verisuonten muodostumiseen VEGF-A:n säätelyn kautta. Hypoksian ja HIF-1 α indusoimat entsyymit voivat myös saada olemassa olevia verisuonia haarautumaan tai jakaantumaan. Syövän mikroympäristön hypoksian indusoima angiogeneesi tuottaa heikkolaatuisia verisuonia, jotka eivät kykene tuomaan alueelle tarpeeksi happea. Vajaa hapentuonti kasvavalle syöpäsolumäärälle saa aikaan lisää hypoksiaa ja se puolestaan lisää angiogeneesiä, mistä seuraa vaarallinen kierre. (Muz ym. 2015)

Angiogeneesiin vaikuttavia soluja TME:ssä ovat perisyytit, CAF:t ja immuunipuolustuksen solut. Syöpäsolujen rekrytoimat luontaisen immunitetin solut voidaan saada tuottamaan pro-angiogeenisiä tekijöitä, jotka avustavat angiogeneesiä. Syöpäsolut voivat myös houkutella viestiaiaineiden avulla paikalle makrofageja, jotka voivat toimia normaaliin tapaan immuunipuolustusta stimuloiden, tai immunosuppressiivisesti syövän kasvua edistämällä sytokiineja sekä proteaaseja, kuten VEGF-A ja MMP-9. Neutrofiilien ja syöttösolujen on myös havaittu indusoivan syövän angiogeneesiä erittämällä parakriinisesti pro-angiogeenisiä tekijöitä. (Baeriswyl & Christofori 2009)

Syövän vaskulaarisia muutoksia voidaan pyrkiä muuttamaan tai angiogeenin käynnistyminen voidaan estää usealla eri lääkeaineella. Esimerkkejä lääkehoidosta ovat kasvutekijä VEGF-A:han vaikuttava bevasitumabi ja kemokiinireseptorin CXCR2 antagonisti. Vaikuttamalla kasvutekijöihin ja kilpailemalla reseptoreista TME:n vaskulaarisia muutoksia saadaan hillittyä ja TME:n proangiogeneettisiä signaaleja vähennettyä. On esitetty, että angiogeneesi estämällä kasvain ei mahdollisesti pääse kehittymään maligniksi, ja syövän prognoosia voidaan parantaa. (Fang & Declerck 2013)

4.5 Kemokiinit

Kemokiinit ovat joukko pieniä kemokiinireseptoreihin sitoutuvia proteiineja, jotka ovat tärkeässä roolissa immuunivasteen ja tulehduksen indusoinnissa, sekä myös syövän progressiossa. Kemokiinit ovat osallisena syövän kasvuun, angiogeneesiin, syöpäsolujen fenotyypin muutokseen, metastasointiin ja immuunipuolustuksen torjuntaan. Kemokiineilla voi toisaalta olla myös syöpäsolujen angiogeneesiä, proliferaatiota tai kasvua inhiboivia vaikutuksia. Kemokiinit voidaan jakaa tulehduksellisiin ja homeostaattisiin kemokiineihin. (Sarvaiya ym. 2013)

CXCL13 toimii normaalisti B-lymfosyyttien liikkumisen säätelijänä, mahdollisesti niiden migraatiossa tulehduspaikalle (Rupprecht ym. 2009). Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet metastasoituvien syöpäsolujen voivan hyödyntää kemokiinien immuunipuolustusta säätelevää migraatiota ilmentämällä samoja reseptoreita kuin immuunipuolustuksen solut. Pandrurada ym. löysivät OSCC kudoksista korkeaa CXCL13 pitoisuutta. CXCL13 osoitettiin myös indusoivan perifeeristen monosyyttien kemotaksista liikkumista *in vitro*. Hiirikokeissa Pandrurada ym. antoivat ihonalaispistoksena suusyöpäsoluja koehiirille. Pistoksen saaneilla hiirillä kehittyi etäpesäkkeitä 4-5 viikon kuluessa ihonalaispistoksesta. Hiirillä havaittiin myös osteolyttisiä muutoksia kallon luiden alueilla. Immunohistokemiallisessa analyysissä syöpäsolujen havaittiin ekspressoivan CXCL13 kemokiinia ja matriksimetallproteaasi-9:ä. Tutkimusten tuloksista pääteltiin CXCL13 kemokiinilla olevan rooli suusyövän metastasoinnissa. (Pandrurada ym. 2010)

Kemokiinien osuudesta invaasioon on myös vastakkaista näyttöä. Salo ym. tutkivat syövän mikroympäristön osuutta karsinogeneesissä. Tutkimuksessa havaittiin luuytimeistä peräisin olevien mesenkymaalisten kantasolujen ja kielisyöpäsolujen välisen vuorovaikutuksen lisäävän CCL5 kemokiinin tuotantoa. CCL5-kemokiinin tiedetään lisäävän syöpäsolujen liikkuvuutta. Tarkemmin tutkittaessa havaittiin kuitenkin, että CCL5 ekspression lisääntyminen ei ollut kriittisen tärkeää syöpäsolujen invaasiolle. ECM proteiineilla, erityisesti tyypin 1 kollageenilla, oli paljon suurempi rooli. (Salo ym. 2013)

Kemokiinit voivat stimuloida pro-angiogeenisten tekijöiden ekspressiota tai sitoutua kemokiinireseptoreihin endoteelisolujen pinnalla ja lisätä angiogeneesiä. Kemokiiniligandi CCL4 korkea pitoisuus OSCC-potilailla yhdistyi edenneeseen syöpään. CCL4:n lisäsi VEGF-C:n ekspressiota ja imusuonten lymfangiogeneesiä *in vitro* ja *in vivo*. VEGF-C on lymfangiogeneesin keskeinen säätelijä. CCL4 kohdistuva hoito voisi estää OSCC:n metastasointia ja lymfangiogeneesiä. (Lien ym. 2018)

Kemokiinireseptori CXCR2 ja sen ligandi lisäävät angiogeneesiä ja leukosyyttien infiltraatiota muun muassa melanoomasoluissa. Happamassa ja vähähappisessa mikroympäristössä syöpäsolut lisäävät CXCR4 ekspressiota, joka auttaa niitä migroitumaan CAF tuottaman CXCL12 gradientin suuntaisesti mikroympäristöön, jossa on enemmän happea käytettävissä. CXCL12-CXCR4 pari suosii metastasointia kauempiin elimiin, kun taas CCL21-CCR7 pari suosii metastasointia imusolmukkeisiin. (Rakoman ym. 2007)

4.6 Immuunipuolustuksen rooli syövän progressiossa

Elimistön immuunipuolustus taistelee ulkopuolisia taudinaiheuttajia vastaan. Immuunipuolustus liittyy olennaisesti myös elimistön sisäisiin uhkiin, kuten autoimmuunisairauksiin ja syöpään. Corthay viittasi artikkelissaan useisiin todisteisiin, jotka liittyvät immuunipuolustuksen toimintaan syöpää vastaan. Immuunivajeesta kärsivillä potilailla on huomattu selvästi kohonnut syöpäriski. Esimerkiksi elinsiirtopotilailla, jotka käyttävät immunosuppressiivisiä lääkkeitä on korkeampi riski sairastua syöpään. HIV-1-infektio liittyy myös kohonneeseen syöpäriskiin. Immuunipuolustussolujen laadulla ja määrällä on todettu olevan vaikutus syövän prognoosiin. Syöpäsoluissa on havaittu mutaatioita geeneissä, jotka liittyvät immuunipuolustukseen, ja syöpäsoluihin tiedetään myös kerääntyvän mutaatioita, joiden avulla solut väistävät immuunireaktioita. Tutkimuksissa on myös havaittu tiettyjen reseptorien omaavien lymfosyyttien pystyvät tuhoamaan premaligneja soluja. Luontaiseen immuunireaktioon pohjautuva syöpähoito on myös osoittanut lupaavia hoitotuloksia. (Corthay 2014) Immuunipuolustuksella ja -reaktioilla on siis keskeinen osa syöpää vastaan, mutta myös syövän progressiossa. TME:n koostumus muokkautuu immuunireaktioiden vaikutuksesta, mikä vaikuttaa myös syövän kasvuun ja leviämiseen.

4.7 Tulehduksen, immuunipuolustuksen ja TME:n välinen vuorovaikutus

Tulehdus on osallisena sekä syöpäsolun alkuvaiheessa, promootiossa ja malignien mutaatioiden synnyssä, että invaasiokyvyn kehittämisessä. Kroonisen tulehduksen, joka liittyy infektiin tai autoimmuunisairauteen, arvellaan edesauttavan syövän kehittymistä. Krooninen tulehdus indusoi onkogeenisiä mutaatioita, lisää angiogeneesiä ja aiheuttaa epästabiileettia genomiin. Myös esim. ylipainoon liittyvä matala-asteinen tulehdus altistaa syöväälle. Syöpähoidot voivat myös laukaista tulehdusvasteen kudosaaurion, nekroosin tai muun trauman seurauksena. Hoitojen aiheuttama tulehdus voi näin johtaa syövän uusiutumiseen ja aiheuttaa resistenssiä hoidolle. Hoidon seurauksena voi toisaalta tapahtua antigeenin esittelyn tehostumista, mikä johtaa syövän immuunivälitteiseen hävittämiseen. (Grivennikov ym. 2010). Tulehduksen ja mikroympäristön välinen vuorovaikutus

muodostuu kompleksista joukosta tulehdusta edistävästä sekä syövän kehitystä säätelevistä sytokiineistä, kemokiineistä, onkogeeneistä, entsyymeistä, transkriptiotekijöistä ja immuunisoluista. (Chai ym. 2015) Pitkään jatkunut tulehdus saa tekijät indusoimaan solujen proliferaatiota sekä aktivoi onko- ja tuumorisuppressorigeenejä ja pidentämään solujen selviytymistä. Tämä johtaa geneettiseen epästabiliteettiin, joka lisää syöpäriskiä.

Syöpään liittyviä tulehdussoluja ovat makrofagit (M1/M2), monosyytit, syöttösolut, neutrofiilit, lymfosyytit ja dendriittisolut. Osa tulehdus- ja immuunisoluista, kuten esim. syöpään assosioituvista makrofageista (TAM), eivät ole TME:ssä normaaliin tapaan puolustuksellisia, vaan lisäävät syöpäsolujen kasvua. Niiden roolista angiogeneesin indusoina, matriksin muokkaajana ja adaptiivisen immunitetin suppressorina on lukuisia havaintoja. TAM:t ovat peräisin monosyyteistä, jotka erilaistuvat eri makrofageiksi riippuen niiden saamista viestimolekyyleistä. Monosyytit rekrytoidaan syövän alueelle syöpäsolujen erittämällä kemokiineillä, kuten CCL2/MCP-15. Useimmat karsinomat tuottavat CCL2-kemokiiniä, ja sen pitoisuuden on havaittu korreloivan TME:ssä esiintyvän lisääntyneen makrofagi-infiltraation kanssa. Makrofagien rekrytointia tapahtuu myös muiden viestiaineiden avulla. (Sica ym. 2006) Syövässä makrofagien eri tyypit toimivat joko syöpää suppressoiden tai promotoiden. M1-makrofagit stimuloivat immunitettia, aktivoivat tulehduksellisia sytokiineja ja toimivat mikrobien vastaisesti. M2-makrofagit puolestaan lisäävät angiogeneesiä, kiihdyttävät kudosten uusiutumista ja edistävät syövän kasvua. Oikean stimulaation saadessaan TAM:t kykenevät siis tuhoamaan syöpäsoluja, mutta TME:ssä ei ole bakteeristimuluksia eikä Th1-sytokiineja, jotka indusoisivat makrofagit M1-polarisaatioon, vaan ne kehittyvät syöpää promoiviksi M2-tyypiksi. (Sica ym. 2006) Useat interleukiinit, kuten IL-1 ja IL-4 indusoivat TAM kehittymisen M2-fenotypiksi, ja esimerkiksi IL-8 indusoi TAM:n angiogeneettisiä ominaisuuksia, ja sitä kautta aikaansaa syöpäsolujen jakaantumista. IL-6 liittyy imusolmukemetastaaseihin ja syöpäsolujen huonoon erilaistumiseen. (Petruzzi, Maria Noel Marzano Rodrigues ym. 2017)

Esimerkiksi suusyöpäriskiä lisäävän betelpähkinän syönti indusoi tulehdusvälittäjäaineiden ja kasvutekijöiden tuotantoa, joka johtaa strooman fibroottisiin muutoksiin lisäten syöpäriskiä. Muodostuneessa syövässä karsinoomasolut sekä strooman fibroblastit, että makrofagit tuottavat TNF- α :a ja IL-6:a. Nämä sytokiinit lisäävät syövän kasvua modifoimalla soluadheesiomolekyylien ekspressiota ja stimuloimalla angiogeneesiä. (Feller ym. 2013) Lichen planus on etiologialtaan tuntematon T-soluvälitteinen krooninen iho- ja limakalvosairaus, jolla suun limakalvoilla esiintyessään on 1-2% riski muuttua levyepiteelikarsinoomaksi. Lichenissä tulehduksen oletetaan aiheuttavan oksidatiivista stressiä sekä tuottavan sytokiineja ja transkriptiotekijöitä, jotka mahdollisesti lisäävät suusyövän kehittymisen riskiä. (Georgakopoulou ym. 2012)

5 SYÖPÄSOLUJEN LEVIÄMINEN

Syöpäsoluilla on kyky lähettää etäpesäkkeitä eri puolille elimistöä, eli metastasoitua. Syövän metastasoituminen on yleisin kuolemaan johtava komplikaatio syöpää sairastavilla. Ennen varsinaista uuteen kudokseen invasoitumista syöpäsolujen primaaripaikalta lähtee signaaleja, jotka luovat metastaasipaikan mikroympäristöön muutoksia. Muutokset muokkaavat mikroympäristöä sopivaksi syöpäsoluille, eli muodostavat premetastaattisen paikan (*premetastatic niche*). (Peinado ym. 2017) Irrottuaan primaarikasvaimesta syöpäsolut tunkeutuvat ekstrasellulaarimatriksin läpi veri- tai imusuoniverkostoon ja päätyvät lopulta vastaanottavaan kudokseen, usein ensimmäisenä imusolmukkeeseen, josta matka jatkuu syöpätyypistä riippuen muihin kudoserakenteisiin. Vastaanottavassa kudoksessa syöpäsolut alkavat tuottamaan proliferaatiosignaaleja ja niiden hallitsematon kasvu uudessa kohteessa alkaa. Metastasoituvat solut tarvitsevat suuren joukon eri entsyymejä ja viestiaineita, jotta ne pystyvät matkustamaan alkuperäiseltä paikalta uuteen kohteeseensa ja proliferoitumaan uudeksi etäpesäkkeeksi. (Irani 2016) Metastasoituminen heikentää huomattavasti potilaan ennustetta.

Ekstrasellulaarimatriksi täyttää solujen välisen tilan, ja muodostaa biomekaanisen vastuksen joka liikkuvien solujen, kuten myös invasoivien syöpäsolujen, on ylitettävä. Soluilla on kaksi vaihtoehtoa vastuksen läpäisemiseen, ECM:n heikentäminen tai ahtautuminen ECM raoista. Syöpäsolujen morfologia ja fenotyyppi määräävät, miten ne käyttäytyvät. Mesenkymaalisesti käyttäytyvät syöpäsolut muokkaavat ECM:a liikkuaan ja amebamaiset syöpäsolut ahtautuvat ECM:n läpi. Syöpäsoluilla on mekanismeja, joilla ne pystyvät joissain määrin vaikuttamaan niiden olomuotoon, ja siihen käyttäytyvätkö ne mesenkymaalisesti vai amebamaisesti. On myös näyttöä, että mesenkymaalisten ja amebamaisten solutyypin välillä on synergistisiä piirteitä. (Hecht ym. 2015) Invasoivien syöpäsolujen välinen synergistinen vaikutus on syytä huomioda esimerkiksi, kun syöpähoito kohdistuu metastasoitumiseen.

5.1 Invaasiokykyyn liittyvät muutokset syöpäsoluissa

Syöpäsolut voivat muokata mikroympäristönsä, mutta myös itseänsä. Seuraavaksi käsitellen lyhyesti niitä muutoksia, joita syöpäsolut käyvät läpi ennen ja migraatio- ja invaasiokykyyn johtavia tapahtumia.

Syöpäsolut voivat invasoitua kudoksiin liikkumalla yhdessä muiden syöpäsolujen kanssa, tai yksittäisinä soluina, käyttäen joko mesenkymaalista tai amebamaista muotoa. (Friedl & Wolf 2003) Syöpäsolut voivat muuntautua fenotyyppiltään epiteliaalisesta mesenkymaaliseksi (EMT),

mesenkymaalaisesta amebamaiseksi (MAT) tai kollektiivisesti amebamaisiksi (CAT). Ryhmänä invasoivat solut saavat liikkumisvoimansa ryhmän kärjessä olevien solujen tarttumispisteillä ja ECM:iin vaikuttamisen avulla. Tarttumispisteet, eli *focal adhesion* (FA), ovat makromolekyylejä, jotka välittävät mekaanista voimaa ja säätelysignaaleja solun ja ECM välillä. (van Zijl ym. 2011)

EMT, eli *epithelial-mesenchymal transition*, on epiteelisoluissa tapahtuva prosessi, jossa solut menettävät solujen välisiä sidoksia ja saavat invaasiokyvyn ja kykenevät irrottautumaan epiteelikerroksen soluista. EMT tapahtuu esimerkiksi ihmisen embryologian alkuvaiheessa, haavan paranemisessa ja syöpäsolujen metastasoitumisen aloituksessa. EMT:a pidetään tärkeänä osana syöpäsolujen invaasiokykyyn johtavaa signaalikaskadia, koska prosessin jälkeen solu kykenee irtautumaan isäntäsoluryppästä ja muodostaa oman yksisoluisen siirtymiseen kykenevän solun. Solujen väliseen irtautumiseen johtavia muutoksia ovat kadheriinien ja kateiinien toiminnan häiriintymiseen johtavat mutaatiot tai kadheriineja pilkkovien proteaasien tuotannon lisääminen. TME voi myös tuottaa sytokiineja, jotka heikentävät solujen välistä liitosta. (Friedl & Wolf 2003, Thiery 2002)

Yksittäinen solu voi irtaantua muiden solujen välistä käymällä läpi EMT:n, jossa E-kadheriinin tuotantoa vähennetään ja solun tukirankaa uudelleen järjestellään. E-kadheriini on reseptori, jonka tehtäviin kuuluu epiteelisolujen välisessä viestinnässä vaikuttaminen. E-kadheriini stabiloi epiteelisolujen välistä vuorovaikutusta sitoutumalla viereisiin epiteelisoluihin. E-kadheriini säätelee myös solunsisäisesti epiteelisolujen liitoskohtien muodostumista. Yksittäinen solu voi liikkua vapaasti FA-molekyyliden avulla ja pilkkomalla ECM:a proteaasien avulla. Nopein syöpäsolujen invaasiotapa on amebamainen liikkuminen, joka aiheuttaa solujen polariteetin häviämisen ja parakriinisesti toimivan soluliikkeen. Syöpäsolut voivat muuntautua amebamaisiksi esimerkiksi beta 1-integriinien inhibitiolla. Beta-1-integriinien inhibitio johtaa syöpäsolujen fenotyypin muuttumiseen CAT, eli *Collective amoeboid transition* avulla. (van Zijl ym. 2011) Integriinit ovat heterodimeerisiä pintareseptoreita, jotka kiinnittyvät ECM:ssa oleviin ligandeihin. Integriinisignalointi säätelee syöpäsolujen migraatiota, invaasiota, proliferaatiota ja kasvua. Tiettyjen integriinien esiintyminen syövässä voi liittyä sairauden etenemiseen ja ennusteen huonontumiseen. Integriinien vuorovaikutus kasvutekijöiden ja sytokiinireseptorien kanssa on syöpäsolujen kasvulle elintärkeää. Vuorovaikutus saa aikaan syöpäsolussa selviytymisen kannalta tärkeitä signaalikaskadeja, jotka johtavat reseptorien ekspressioon, ligandiaffiniteettiin ja signalointiin. (Desgrosellier & Cheresch 2010)

CAT tarkoittaa syöpäsolujen kollektiivista amebamaista transitiota. CAT läpikäyneet syöpäsolut vähentävät beta 1-integriinien tuotantoa ja irtoavat ympäröivistä soluista. Irronnut syöpäsolujoukko liikkuu amebamaisesti soluvälitilassa. Amebamaiseen liikkumiseen liittyy proteaasien ja integriinien

ekspression väheneminen, GTP-aasien aktivaation väheneminen, Rac1 inhibitio ja RhoA aktivaatio. Ameebamaista liikettä voi tapahtua tilavassa ECM:ssä. Mesenkymaalinen liike on tyypillistä ahtaassa ECM:ssä. (Krakhamal ym. 2015)

Tietyissä olosuhteissa voi EMT:n sijaan tapahtua MAT, eli mesenchymal-amoeboid transition, jossa syöpäsoluista tulee amebamaisia soluja. Kun mesenkymaaliset syöpäsolut ovat morfologialtaan fibroblastin kaltaisia, ovat amebamaiset pyöreitä, mukautuvia ja pystyvät liikkuvaan soluvälitiloissa. Amebamaisilla soluilla integriinit ovat lyhyitä ja sulautuneet solukalvoon, eroja esiintyy myös kudosläpäisevyydessä, integriinien jakaantumisessa ja aktiini tukirakenteissa. MAT muutoksen voi aiheuttaa esimerkiksi proteaasi-inhibiittorien aiheuttama solunsisäisen proteolyysin kumoaminen, solu-ECM liitoksen heikkeneminen ja RHO signaalikaskadin inhibitio. (Pankova ym. 2010) Syöpäsoluissa voi tapahtua myös päinvastainen muutos mesenkymaaliseksi soluksi, eli AMT.

5.2 Invaasion ja metastasoinnin indusointi

Kuten aikaisemmin esitettiin syöpäsolut voivat invasoitua kollektiivisesti usean solun ryppäinä tai yksittäisinä soluina. (Friedl & Wolf 2003) Syöpäsolut ja normaalit solut käyttävät samoja mekanismeja muodon muuttamisessa, liikkeen aikaansaamiseksi ja ECM muokkauksessa. Syöpäsolut eivät kuitenkaan noudata fysiologisia rajoitteita ja esteitä, joilla liike pysäytetään ja solut istutetaan kohteeseensa. (Friedl & Alexander 2011)

Invasoituvan solun liike alkaa usean viestiproteiinin avulla, jotka kiinnittyvät solun reseptoriin. Reseptoriaktivaatio saa aikaan signaalikaskadin käynnistymisen, jotka säätelevät solun aktiinitukirangan polymerisoitumista ja uudelleenjärjestäytymistä. Uudelleen järjestäytyneillä aktiinifilamenteilla on vapaat päätteet, joiden suuntaan solun liike on mahdollista. Uudet aktiinifilamentit muodostavat komplekseja proteiinien, kuten WASP ja Arp2/3 kanssa, jotka puolestaan rekrytoivat matriksia pilkkovia proteaaseja auttamaan solua kulkemaan ECM läpi. (Yamaguchi & Condeelis 2007) Invasoituvan solun liikkuminen voidaan yksinkertaistaa vaiheittaiseksi. (i) Ensimmäisen vaiheen aktiinitukirangan polymerisaatiota seuraa ECM komponenttien kohtaaminen, johon reagoidaan kompleksien muodostumisella. Solun ECM väliin liukuvan kärjen takana proteaasit pilkkovat solun ulkoisia komponentteja, antaen tilaa solun liikkeelle. (ii) Seuraavassa vaiheessa solun peräpää saadaan mukaan liikkeeseen GTPaasi Rho:n aktivoimalla myosiini II:lla. Solussa tapahtuu aktivoinnin jälkeen aktomyosiinin tuottama jännite, joka vetää solun peräpään kärjen kulkusuuntaan. Kollektiivisessa migraatiossa solujen ulokkeita ja vetäytymistä säädellään solujen välisten liitosten avulla, mikä mahdollistaa solujen toimia ryhmänä samalla periaatteella. (Friedl & Alexander 2011)

Proteaasien lisääminen auttaa syöpäsolujen invaasiota ja progressiota. Solun pinnan proteaasit, pääasiassa MMP:t ja ADAM:t, tuhoavat proteolyttisesti ECM:n proteiineja, mikä luo tilaa solun liikkeelle sekä synnyttää ECM:n komponentteja, joilla on adheesiota ja migraatiota lisääviä vaikutuksia. Solun pinnalle eritetyt proteaasit käsittelevät entsyymaattisesti toisia proteaaseja ja solun pinnan reseptoreita, kuten adheesio- ja kasvutekijäreseptoreita. Tämä kontrolloi reseptorien aktivaatiota ja mahdollistaa adaptiiviset muutokset. Proteaasit myös säätelevät saatavilla olevien solun ulkoisten kasvutekijöiden saatavuutta. (Friedl & Alexander 2011)

5.3 Premetastaattinen paikka (*premetastatic niche*)

Syöpäsolujen metastaasin kohteessa on tiedetty jo pitkään tapahtuvan muutoksia ennen varsinaisten syöpäsolujen saapumista kohdekudokseen. Stephen Paget esitti 1800-luvun lopulla teorian, jonka mukaan tiettyntyyppiset syöpäsolut levisivät spesifisiin paikkoihin, joissa oli samankaltaiset kasvuolosuhteet. (Paget 1889) Metastaasiin ryhtyvät solut alkavat muokkaamaan kohde-elimensä mikroympäristöä niille suotuisemmaksi. Muokkaus tapahtuu syöpäsolujen lähtöpaikalta viestiaiaineiden kuten kasvutekijöiden, hormonien, sytokiinien, kemokiinien ja ECM komponenttien avulla. Muokkauksen toinen tärkeä tekijä on ekstrasellulaarivesikkelit (EV:t). EV:t ovat solujen soluvälitilaan vapauttavia membraanin ympäröimiä rakenteita. EV:ien ja viestiaiaineiden avulla saadaan luotua paikallinen syöpäsoluille sopiva elintila, eli nk. *Premetastatic niche* (PMN). (Peinado ym. 2017) Syöpäsolujen on osoitettu käyttävän EV:tä suppressoimaan ei-syöpäsolujen glukosinotokyä. Syöpäsolujen erittämät mikro-RNA:ta sisältävät EV:t saavat aikaan enemmän vapaata ravintoa PMN:ssä syöpäsolujen käyttöön. (Fong ym. 2015)

Vaskulaarisesti syöpäsolut voisivat levitä lähes koko elimistöön, mutta solujen on osoitettu suosivan hakeutumista spesifisiin kohde-eliiniin. (Fidler & Nicolson 1976, Hart & Fidler 1980) Kohdespesifisten syöpäsolujen erittämien EV:ien on havaittu fuusioituvan kohdesoluihin. Syöpäsolujen EV:ssä on esim. integriinejä, jotka voidaan tunnistaa kudoksia metastaasispesifisyyden mukaan. Integriineihin vaikuttamalla metastaasi ja EV:n ilmentyminen PMN:ssä on pystytty vähentämään. EV integriinien avulla voidaan ennustaa elin spesifisiä metastaasipaikkoja. (Hoshino ym. 2015)

PMN muodostuminen tapahtuu asteittaisesti. Kaplan ym. osoittivat ensimmäisinä tutkimuksessaan, että VEGF-reseptori 1 (VEGFR1) ekspressoivat luuytimen kantasolut suuntasivat tulevaan metastaasikohtaan ja muodostivat soluryppäitä. VEGFR1-reseptorin suppressointi esti soluryppäiden muodostumisen ja vähensi metastaasin tapahtumista. Tutkimuksessa havaittiin myös, että syöpäsolujen kasvutekijät saivat kohdekudoksen fibroblastit ekspressoimaan proteiinia, joka toimi

ligandina VEGFR1:lle. Muutokset johtivat otolliseen kasvualustaan metastasoiville syöpäsoluille. (Kaplan ym. 2005) Joten syöpäsolujen tulevan ympäristön koostumus muokkautuu jo ennen syöpäsolujen saapumista, mutta syöpäsolut vaikuttavat myös paikallisesti ympäristöönsä niiden kasvun aikana.

6 IMUSOLMUKKEIDEN MERKITYS SYÖPÄSOLUJEN LEVIÄMISESSÄ

Imusolmukkeet ovat imusuonijärjestelmän osia, jotka ovat tärkeitä immuunijärjestelmän normaalille toiminnalle. Imusolmukkeet ovat keskeisiä lymfositien, eli T- ja B-solujen aktivaatiossa. Lymfositit toimivat puolustuksessa elimistön ulkoisia patogeenejä vastaan. Elimistön kohdatessa ulkoisen patogeenin, esitellään sen antigeeni dendriittisolujen toimesta T-soluille. T-solut opetetaan tunnistamaan vieras antigeeni, jolloin alkaa immuunipuolustus antigeenin omaavia mikrobeja vastaan. Osa jakaantuneista T-soluista matkaa B-solujen follikkeleihin ja ne lisäävät B-solujen jakaantumista ja kypsymistä. B-solut puolestaan alkavat tuottaa vasta-aineita, jotka ovat tärkeitä infektioiden torjunnassa. Imusolmukkeissa on runsaasti veri- ja imusuoniyhteyksiä, jotta lymfositit pääsevät tehokkaasti paikalle. (Willard-Mack 2006)

Suun levyepiteelikarsinoomassa metastaasien määrä kaulan alueen imusolmukkeissa vaikuttaa syövän prognoosiin. Kiinalaisessa tutkimuksessa seurattiin 275 suusyöpää sairastavaa potilasta leikkaushoidon jälkeen. 32,7 % potilaista syöpä uusiutui 2-96 kuukauden aikana. Uusiutumiseen vaikuttivat syövän erilaistumisaste, leikkauksen laajuus ja imusolmuke- sekä verisuoni-invaasio. Prognoosin parantamiseksi tutkimuksessa suositeltiin laajempaa leikkausaluetta, tehostettua kemoterapiaa sekä kaulan alueen imusolmukkeiden poistoa korkean uusiutumisriskin potilailla. (Wang ym. 2013)

Suun alueen levyepiteelikarsinoomilla tiedetään olevan taipumus levitä kaulan alueen imusolmukkeisiin. Riski kaulan alueen etäpesäkkeisiin on riippuvainen kasvaimen koosta ja sijainnista. Mikäli potilaalla todetaan riittävän suuri riski etäpesäkkeille syöpäpotilaalle annetaan ennalta ehkäisevänä, eli profylaktisena, hoitona sädehoito tai kauladissektio. Kauladissektiossa poistetuiksi määräytyvät alueet valitaan pääkasvaimen sijainnin ja todettujen etäpesäkkeiden perusteella. Profylaktisten kauladissektioiden on osoitettu parantavan suusyöpäpotilaiden ennustetta. Kaulan alueen syöpähoidot heikentävät normaalia imunestekiertoa, mistä voi seurata turvotusta. Valitsemalla sopivan laajuksen kauladissektion voidaan potilaan hoidon ennustetta parantaa, ja hoidon komplikaatiot saadaan minimoitua. (Atula ym 2017)

6.1 Rakenteet

Imusolmukkeet muodostuvat uloimmasta korteksista, keskimmäisestä parakorteksista ja sisimmästä medullasta. Imusolmukkeet sisältävät yhden tai useamman lohkon, joita ympäröi imunesteen, eli lymfan, täyttämä sinusverkosto. Lymfan virtaus imukudokseen tapahtuu sinuksia pitkin. Lohkoihin tulevat tuovat sinukset tyhjenevät korteksin alapuolelle, josta lymfan virtaus jatkaa kohti medullaa päätyen vievään imusuoneen. Imusolmukkeen lohkoilla on kärki ja runko, jotka ankkuroituvat ympäröivään imusolmukkeeseen verisuonten avulla. Lohkon kärkiosa muodostaa korteksin ja runko medullan. Korteksi on kaksikerroksinen rakenne, josta erottuvat syvempi ja pinnallinen osa, joka tunnetaan myös parakorteksina. Pinnallinen korteksi sisältää pyöreitä follikkeleita, joita ympäröivät follikkelien välinen korteksi. Parakorteksi rakentuu syvästä kortekstiyksiköstä (*deep cortex unit*, DCU). DCU:t yhdistävät yleensä lohkojen pohjalla isommaksi kompleksiksi. B-lymfosyyttejä esiintyy yleisemmin korteksin ulommalla alueella ja T-lymfosyyttejä sisemmällä alueella lähellä parakorteksia. Lymfosyytit muodostavat imukeräsiä, joissa tapahtuu lymfosyyttien proliferaatiota. Lymfosyytit kulkeutuvat imusolmukkeisiin sisemmän korteksin nk. *high endothelial venules* (HEV) endoteelisolujen välistä. (Willard-Mack 2006)

Imusolmukkeet ovat tärkeitä elimistön immuunipuolustuksen elimiä, joiden keskeistä roolia syövän leviämisessä on alettu vasta viime vuosikymmeninä ymmärtämään.

6.2 Invaasion mahdollistavia muutoksia imusolmukkeissa

Imusolmukkeiden rooli syövässä ei ole vielä täysin selvä. Sen sijaan tiedetään, että syöpäsolujen proliferaatioon ja leviämiseen liittyy läheisesti kemokiinien, sytokiinien ja immunosuppressiivisten solujen lisääntynyt tuotto sekä veri- että imusuonten muokkaaminen. Useissa tutkimuksissa on havaittu syöpäsolujen hakeutuvan imusolmukkeisiin kemokiinisignaalien avulla, joita erittävät imusolmukkeen mikroympäristön strooman tai immuunipuolustuksen solut. Kemokiinien tiedetään myös säätelevän immuunisolujen ja strooman solujen aktiivisuutta. Imusuonten ja -solmukkeiden rooli paikallisessa tulehdusvasteessa ja immuunisuppressiivisen mikroympäristön luomisessa imusolmukkeisiin on syövän invasoitumisen kannalta elintärkeää. (Pereira ym. 2015a)

Normaalissa naiivissa imusolmukkeessa dendriittisolujen esittelemät antigeenit laukaisevat T-lymfosyyttivasteen immuunireaktiona vierasta antigeeniä kohtaan. On kuitenkin havaintoja siitä, että imusolmukkeissa tapahtuu muutoksia jo ennen vieraan antigeenin saapumista. Vered ym. tutkivat suusyöpäpotilaiden imusolmukkeita, joissa ei vielä esiintynyt etäpesäkkeitä. 435 imusolmukkeenäytteestä analysoitiin histopatologisia muutoksia. Muutoksia verrattiin 328

imusolmukenäytteeseen, joissa esiintyi etäpesäkkeitä. Histopatologisia muutoksia tarkasteltiin kapselipaksuuden, subkapsulaaristen ja medullaaristen sinusten laajenemisen, lobulaarisen rakenteen ja kortikaalisesti aktiivisten follikkelien määrän osalta. Tutkimuksessa havaittiin kapselipaksuuden, lobulaarisen rakenteen ja reaktiivisten follikkeleiden määrän assosioituvan potilaiden kuolinajan kanssa. (Vered ym. 2014) Tutkimuksen tuloksesta voidaan päätellä, että imusolmukkeissa tapahtuu histopatologisia muutoksia jo ennen metastasoivien syöpäsolujen saapumista.

Imusolmukkeessa esiintyy lymfangiogeneesiä, HEV muokkausta, immuunisolujen määrän vaihtelua ja sytokiinien sekä kemokiinien tuotantoa. Imusolmukkeen läpi virtaa enemmän lymfaa ja sen koko on kasvanut, mikä voi olla myös kliinisesti palpoitavissa. Muutosten arvellaan mahdollistavan invasoivien syöpäsolujen kasvun imusolmukkeessa. Syöpäsolujen invasoima imusolmuke käy läpi lisää muutoksia. Imusolmukkeen HEV menetetään, lymfangiogeneesi taantuu ja lymfosyyttien rekrytointi häiriintyy. Imusolmukkeen koko kasvaa ja sytokiinien sekä kemokiinien ekspressio lisääntyy entisestään. Muutokset voivat lopulta inhiboida immuunivastetta, ja lisätä syövän leviämistä uusiin elimiin. (Pereira ym. 2015a)

Uusien imusuonten kasvattaminen ja vanhojen imusuonten uudelleen muokkaus, eli lymfangiogeneesi, toimii metastasoitumisen tärkeänä askeleena. Imusuoniverkosto on tärkeä immuunipuolustuksen, kudosten homeostaasin ja rasva-aineenvaihdunnan toiminnan takia. Syöpäsolut ja TME:n solut tuottavat lymfangiogeneesiä lisääviä kasvutekijöitä. Hiirimalleissa on havaittu lymfangiogeneesiä stimuloivien VEGF-C:n ja VEGF-D:n lisäävän syöpäsolujen metastaasia. Kliinisissä tutkimuksissa on myös todettu, että lymfangiogeneesin ja lymfaverkoston muokkaus korreloivat syövän kehittymisen kanssa. (Stacker ym. 2014) VEGF-C signaaliketju aktivoi integriinejä imusolmukkeen endoteelissä, mikä houkuttelee paikalle adheesiomolekyylejä ilmentäviä syöpäsoluja. Syöpäsolut kerääntyvät siis imusolmukkeisiin VEGF-C:n aktivoiman signaalin seurauksena. (Pereira ym. 2015b) Abdul-Aziz ym. analysoivat 72 histologista näytettä OSCC potilailta ja löysivät korrelaation imusolmukemetastaasien ja VEGF-C:n välillä. VEGF-C:tä esiintyi 97%:ssa karsinomanäytteissä, sekä epiteeli- että sidekudoksen soluissa. VEGF-C:n lisääntynyt määrä yhdistyi imusolmukemetastasointiin ja imusuonten morfologisiin muutoksiin. (Abdul-Aziz ym. 2017)

Suusyövän hoito vaatii yleensä kirurgiaa. Suusyövällä on leviämistaipumus kaulan alueen imusolmukkeisiin ja on havaittu, että poistamalla kaulan alueen imusolmukkeita suusyöpäpotilaiden ennustetta on voitu parantaa. Selektiivisellä kirurgialla on havaittu parempia tuloksia perinteiseen terapeutiseen kirurgiaan verrattuna. (D'Cruz ym. 2015) On syytä olettaa että imusolmukkeiden mikroympäristössä tapahtuu muutoksia ennen varsinaista metastasointia. Suusyöpäsolujen

leviämistavat imusolmukkeisiin voi noudattaa tässä tutkielmassa käsiteltyjä mekanismeja. Syöpäsolujen leviäminen on monimutkainen ja monisyinen tapahtuma, joka vaatii vielä runsaasti lisätutkimusta sen ymmärtämiseksi.

7 KOKEELLINEN OSUUS

Osallistuin yhdessä FM Katja Tuomaisen kanssa suusyövän kokeelliseen invaasiotutkimukseen, jonka tarkoituksena oli selvittää potilaan kieli- ja kurkunpääsyövistä eristettyjen primaari- ja metastaasisolujen invaasiokykyä erityyppisiin syöpäkasvaimen solunulkoista väliainetta korvaaviin matrikseihin.

7.1 Tutkimuksen menetelmät

Invaasiokoe tehtiin sekä primaari- että metastaasi kielisyöpälinjoilla (UT-SCC 24A ja 24B), että kurkunpääsyöpäsolujen primaari- ja metastaasisolulinjoilla (UT-SCC 42A ja 42B), jotka tutkimusryhmä oli saanut prof. Reidar Grenmanin laboratoriosta (Takebayashi ym. 2004). Solujen kasvatus tapahtui mediumissa.

Mediumin koostumus: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12, 1:1 (Gibco) täydennettynä 10% lämpöinaktivoidulla naudan sikiön serumilla (FBS, Gibco), 50 µg/ml askorbiinihappo, 100 U/ml penisilliini, 100 µg/ml streptomysiini, 250 ng/ml amfoterisiini B ja 0,4 µg/ml hydrokortisoni.

7.1.1 Lymfogeelin valmistus ja muut käytetyt geelit

Invaasiokokeessa käytetyt matriksit olivat Lymfogeeli Myogeeli-Fibriini, Myogeeli-Growdex, Myogeeli-kollageeni, tyypin I kollageeni (rotta) ja fibriini.

Lymfogeelin valmistus noudatti Myogeelin valmistusprotokollaa. (Salo ym. 2015) Oulun koe-eläinkeskukselta (KEKS) saatuja porsaan imusolmukkeita käytettiin Lymfogeelin valmistukseen. Nestemäisessä työssä jäädytetyt imusolmukkeet leikattiin pienemmiksi paloiksi, ja hienonnettiin CryoMill:iä (Retsch, Haan, Germany) käyttäen jauheeksi. Kudosjauheeseen lisättiin 10 ml urea puskuria (2 M urea, 0,05 M Tris, 0,154 M NaCl, pH 7,4). Liuos homogenisoitiin T 18 Ultra-Turrax® (IKA) käyttäen, ja liuos jätettiin yön yli sekoittumaan +4 °C lämpötilaan. Seuraavana päivänä näyte sentrifugoitiin 20 min +4 °C (14 000 rpm, SS-34 -roottori). Pohjalle muodostunut pelletti liuotettiin 5 ml ureapuskuriin ja homogenisoitiin Ultra-Turraxia käyttäen. Homogenisoitu liuos sentrifugoitiin edellä mainittuun tapaan. Liuos siirrettiin dialyysiputkeen. Dialyysiputken MWCO (*Molecular weight cut-off*) oli 8 kDa, ja dialyysi tapahtui 900 ml Tris puskuroitua suolaliuosta (TBS) vastaan.

Liuosta pidettiin TBS (pH 7.4, lisänä 5ml kloroformia) 2 tuntia +4 °C. Liuos vaihdettiin 1000 ml TBS:n, (pH 7.4), ja inkuboitui yön yli +4 °C. Seuraavana päivänä dialyysiliuos vaihdettiin uuteen 1000 ml TBS:n. Dialyysia jatkettiin 2 tuntia +4 °C, jonka jälkeen liuos vaihdettiin seerumi-vapaaseen mediumiin (DMEM/F-12) sekä liuosta sekoitettiin yön yli +4 °C. Seuraavana päivänä näyte sentrifugoitiin 4 minuutin ajan +4 °C (1400 rpm Eppendorf A-4-62 roottori) ja supernatantti jaettiin 500 µl eriin.

Growdex on nanofibrillistä selluloosaa (NFC), jota käytetään imitoimaan solunulkoista matriksia. NFC on kasvipärisestä materiaalista valmistettua materiaalia, joka edesauttaa kolmiulotteista kasvua soluvälitilassa. Ei-eläinperäisenä tuotteena se ei myöskään aiheuta immunologisia komplikaatioita. (UPM Biomedicals, 2019)

Myogeeli on ihmisen leiomyoomakasvaimesta valmistettu TME:ä jäljittelevä matriksi. Myogeeli sopii hyvin syövän invaasiokokeisiin, sillä se on ihmiskudosta, ja muistuttaa mikroympäristöltään syövän mikroympäristöä. Myogeenin valmistus on samanlainen kuin ylempänä kuvattu Lymfogeelin valmistus. Kudos jäädytetään nestemäisellä typellä ja hienonnetaan jauheeksi. Kudosjauhe altistetaan NaCl puskuriin ja homogenisoidaan. Proteiinikonsentraatio ja absorbanssi mitataan. Lopuksi proteiinikonsentraatiot laimennetaan yhtä suuriksi eri verrokeille. (Salo ym. 2015)

7.1.2 Solujen invaasiokokeet

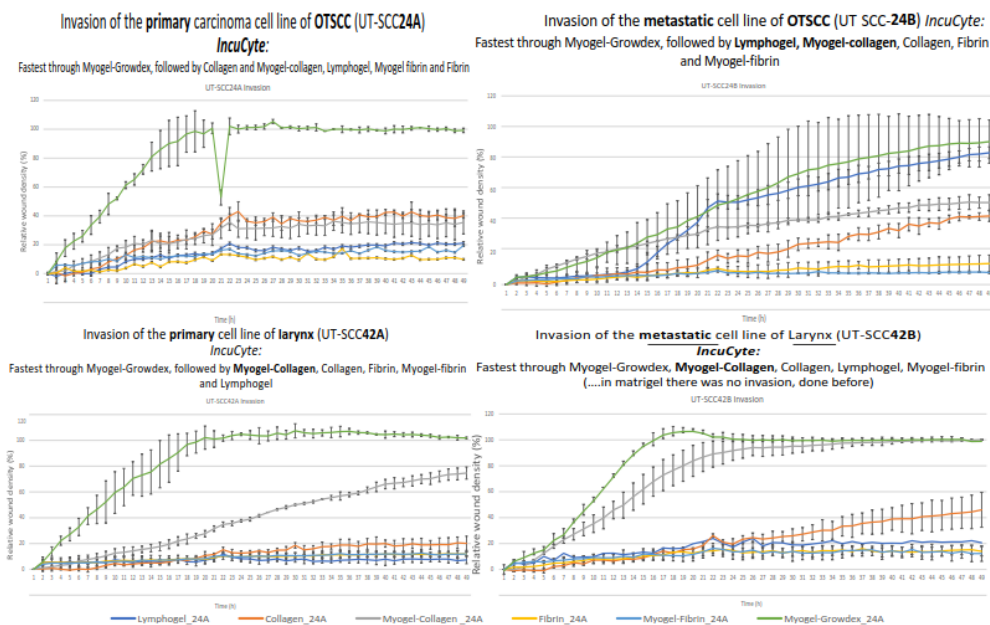
Invaasion mittaamiseksi käytettiin IncuCyte Live-Cell kuvantamismenetelmää. IncuCyte ImageLock 96-well levyt (Essen Bioscience) päällystettiin eri matrikseilla (0,5 mg/ml) valmistajan ohjeiden mukaisesti ja jätettiin inkuboitumaan yön yli 37°C. Käytettyjä matrikseja olivat Myogel-growdex, Kollageeni, Myogeeli-kollageeni, Lymfogeeli, Myogeeli-fibriini sekä Fibriini. 25000 HSC-3, 30000 SCC-25 ja 25000 SAS solua laitettiin eri geeleillä päällystetyille levyille ja inkuboitui yön yli 37°C.

Solukerroksiin tehtiin haavapinta käyttäen 96-well WoundMaker:ia (Essen Bioscience). Invaasion mittaamiseksi solujen päälle lisättiin matriksi kerrosja solujen liikkumista kuvattiin käyttäen IncuCyte Live-Cell kuvantamismenetelmää. Kuvia otettiin 48 tunnin ajan 2 tunnin välein. Kuvista tulkittiin RWD (*relative wound density*) -% invaasion mittaamiseksi. RWD mittaa kahden eri pisteen solutiheyksien suhdetta. Kokeessa RWD mittasi tehdyn haavapinnan solutiheyden suhdetta alueen ulkopuoliseen solutiheyteen. Alkutilanteessa RWD on 0 % ja se saavuttaa 100 %, kun solutiheys haava-alueen sisällä on sama kuin solutiheys alueen ulkopuolella. RWD-% tulkitsemalla kokeesta voidaan päätellä, kuinka nopeasti syöpäsolut kasvavat ja invasoituvat tehtyyn haava-alueeseen.

Nopeasti saavutettu suuri RWD arvo kuvaa, että invasoivat solut ovat levinneet hyvin kyseistä matriksia sisältävään haava-alueeseen.

7.2 Tulokset

Kielisyövän primaarisyöpäsolulinjan solut (OTSCC-24A) invasoituivat parhaiten Myogel-Growdex:iin (Kuva 2 yläriivi, vasen). Metastaaseista eristetyin solulinjan (OTSCC-24B) solut invasoituivat lymfogeeliin lähes yhtä tehokkaasti kuin Myogel-Growdexiin (Kuva 2, yläriivi oikea) Kurkunpään primaarisyövästä eristetyt solut invasoituivat tehokkaasti Myogel-Growdex:iin (Kuva 2 alariivi vasen), mutta metastaasista eristetyt solut invasoituivat myös Myogel-Collagen matriksiin (Kuva 2 alariivi oikea). Muissa alustoissa ei invaasiota juuri tapahtunut.



Kuva 2. Invaasiokoe eri matrikseilla. invaasiokokeissa käytettiin Lymphogel, Collagen, Myogel-Collagen, Fibrin, Myogel-Fibrin, Myogel-Growdex matrikseja. Tutkittavat olivat kielisyövän (UT SCC-24A ja UT SCC-24B) ja kurkunpään syövän primaari (A) ja metastaasi (B) solulinjat (UT SCC-42A ja UT SCC-42B). Invaasiota mitattiin RWD-% indeksillä, joka ilmoitti invaasion prosentuaalisen määrän verrattuna solujen lähtöpaikkaan.

8 POHDINTA

Suusyöpä ja erityisesti kielisyöpä on yhä erittäin invalidisoiva ja tappava tauti, jonka ennusteeseen vaikuttaa erittäin paljon aikainen havaitseminen. Varhaisella diagnostiikalla parannetaan potilaan ennustetta, ja vähennetään hoidoista aiheutuvia haittoja. Varhaisen diagnostiikan kannalta on tärkeää tuntea suun alueen syöpien käyttäytyminen ja mikroympäristön muutokset.

Suun alueen syöpien pääasiallisena hoitona on yhä leikkaushoito, jota tukemaan käytetään toisinaan sädehoitoja, myös kemoterapiaa. Viime aikaisissa tutkimuksissa on pystytty paremmin ymmärtämään kasvaimen mikroympäristön eri komponenttien merkitys syövän etenemisessä. Mikroympäristöön tähtääviä lupaavia lääkehoitoja onkin jo testattu tutkimuksissa. Esimerkiksi Specenier ym. (2018) testasivat kliinisessä tutkimuksessaan nivolumab lääkkeen tehoa potilailla, joilla oli uusiutunut OSCC. Nivolumab stimuloi elimistön immuunipuolustusta estäen PD-1-proteiineja T-solujen pinnalta. PD-1:n estäminen aktivoi T-soluja tuhoamaan syöpäsoluja parantaen puolustusta syöpää vastaan. Tutkimuksen mukaan testipotilailla oli keskimäärin 7.5 kuukautta elinaikaa verrattuna 5.1 kuukauteen konservatiivista hoitoa saaneilla. (Specenier 2018)

UPM rahoittamien tutkimusten mukaan selluloosasta valmistettu Growdex-matriksi mahdollistaa syöpäsolujen kolmiulotteisen kasvun. MCF7 rintasyöpäsolut muodostivat Growdexissä tasaisen sferoidin (Niklander & Paasonen 2019). BT474 rintatiehytkarsinooma ja COLO205 kolorektaali adenokarsinooma -solulinjojen metastaasilinjat pystyivät myös proliferoitumaan ja muodostamaan 3D rakenteita Growdexissä. Tulosten perusteella Rantala ym arvioivat Growdexin sopivan kasvumatriksiksi syöpäsoluille. Nanofibrillistä selluloosaa pidetään biologisesti reagoimattomana materiaalina, joka ei kuitenkaan rajoita solujen kolmiulotteista kasvua. (Rantala ym 2019) Myogeeli-Growdex näyttää myös omien tulostemme perusteella tehokkaimmin lisäävän kaikkien kokeissamme käytettyjen solulinjojen invaasiota. Tulos voi johtua Growdexin nanofibrillisestä rakenteesta ja Myogeelin soluille edullisista TME rakenteista.

Kielisyövän metastastaasista eristetyn UTSCC-24B -solulinjan solujen selkeä invaasioherkkyys Lymfogeeliin voi johtua niiden kyvystä liikkua imukudoksessa. Zhuang ym (2010) havaitsivat lymfaattisten endoteelisolujen (LEC) interaktioita kielikarsinoomasolujen kanssa. Altistuttuaan metastaasiaktiivisille syöpäsoluille, LEC:t lisäsivät syöpäsolujen migraatiota, mikä mahdollisesti selittyi sillä, että LEC-solut erittävät migraatiota stimuloivia kemokiineja, kuten CCL2:ta. Tämän kemokiinin reseptorien yliekspressiota on löydetty useissa eri syövässä. OTSCC soluilla on affiniteettia imukudoksiin, ja Zhuang ym. (2010) tutkimuksessa nostettiin esille LEC rooli syöpäsolujen ohjauksessa imutiehysiin.

OSCC potilailla, joilla etäpesäkkeitä esiintyi kaulan alueen imusolmukkeissa, havaittiin selvästi suurempi CCR7 kemokiinireseptoripitoisuus. Korkea CCR7 pitoisuus assosioitui myös kasvaimen kokoon ja luokitukseen. Korkea CCR7 pitoisuus on yhdistetty useisiin maligneihin syöpiin ja niiden imusolmukehakuisuuteen. (Shang ym. 2009, Weber 2008)

OTSCC tiedetään olevan imukudoshakuisuutta, mikä osaltaan voi selittää tuloksemme, jonka mukaan metastaaseista eristetyt kielisyöpäsolut liikkuvat hyvin nimenomaan imukudosmatriksissa eli Lymfogeelissä. Tuloksien tarkennukseksi jatkossa on tarkoitus tehdä invaasiokokeita myös syöpää sairastaneiden potilaiden kaulan imukudoksella. Tutkimalla tarkemmin syöpäpotilaiden metastaasisolujen invaasiota imusolmukekudokseen voitaisiin toivottavasti luoda parempi kuva invaasioon vaikuttavista mikroympäristön tekijöistä ja mahdollisesti testata uusia lääkehoitoja mahdollisimman edustavissa koeolosuhteissa.

Tuomainen ym (2019) testasivat tutkimuksessaan suusyöpälääkkeiden käyttäytymistä myoomakasvaimesta valmistetussa matriksissa, eli Myogeelissä. Myogeelimatriksissa saatu vaste muistutti enemmän kliinisissä kokeissa saatuja tuloksia, kuin samojen lääkeaineiden testaus muovin päällä tai Matrigeelissä. Tulokset antavat viitteitä, että ihmiskudosta jäljittelevä matriksi parantaa *in vitro* syöpälääkkeiden testauksen ennustettavuutta verrattuna nykyisin käytössä oleviin menetelmiin. (Tuomainen ym 2019)

Invaasiokokeiden tulokset viittaavat, että syöpä ei invasoidu samoin kaikkiin matrikseihin, vaan solulinjoilla on omat preferenssinsä invaasion suhteen (Naakka ym. 2019). Syöpäsolujen liikkeen ymmärtämiseksi tarvitaan vielä lukuisia lisätutkimuksia, jotta voidaan luoda tarkempi kuva invaasioprosessista. Syövän invaasiota ei pystytä tutkimaan *in vivo*, joten on oleellista saada kehitettyä mahdollisimman hyvä matriksi simuloimaan elimistön TME:tä. Lymfogeelimatriksia kehittämällä voitaisiin simuloida erityisesti imusolmukehakuisten syöpien invaasiota, ja sitä kautta kehittää hoitoja näitä vastaan. Syövän mikroympäristöä imitoivilla matrikseilla on myös mahdollisia sovelluksia henkilökohtaisia hoitovaihtoehtoja suunniteltaessa.

Tuntemalla TME:n vuorovaikutus syöpäsolujen kanssa voidaan mahdollisesti kehittää syövän eri kasvu- ja invaasiomekanismeihin kohdistuvia, tehokkaampia hoitoja ja parantaa tulevaisuudessa suusyöpäpotilaiden eloonjäämisennustetta.

9 LÄHTEET

- Abdul-Aziz MA, Amin AK, El-Rouby DH & Shaker OG (2017). Lymphangiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma: Correlation with VEGF-C Expression and Lymph Node Metastasis. *International Journal of Dentistry*: 10.1155/2017/7285656.
- Atula T, Aro K, Mäkitie A, Keski-Säntti H (2017). lääketieteellinen aikakauskirja *Duodecim*;133(17) : 1571-9
- Baeriswyl V & Christofori G (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in cancer biology* 19(5): 329-337.
- Balkwill FR, Capasso M & Hagemann T (2012). The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science* 125(Pt 23): 5591-5596.
- Bergers G & Benjamin LE (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews.Cancer* 3(6): 401-410.
- Carmeliet P (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3: 4-10.
- Chai EZ, Siveen KS, Shanmugam MK, Arfuso F & Sethi G (2015). Analysis of the intricate relationship between chronic inflammation and cancer. *The Biochemical journal* 468(1): 1-15.
- Chen F, Zhuang X, Lin L, Yu P, Wang Y, Shi Y ym. (2015). New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC medicine* 13: 7.
- Chuang SL, Su WW, Chen SL, Yen AM, Wang CP, Fann JC ym. (2017). Population-based screening program for reducing oral cancer mortality in 2,334,299 Taiwanese cigarette smokers and/or betel quid chewers. *Cancer* 123(9): 1597-1609.
- Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y ym. (2012). Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer cell* 21(1): 66-81.
- Corthay A (2014). Does the immune system naturally protect against cancer? *Frontiers in immunology* 5: 197.
- D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R ym. (2015). Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. *The New England journal of medicine* 373(6): 521-529.
- Desgrosellier JS & Chersesh DA (2010). Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature reviews.Cancer* 10(1): 9-22.
- Dourado MR, Guerra ENS, Salo T, Lambert DW & Coletta RD (2018). Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of oral pathology & medicine* : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology 47(5): 443-453.

- Duronio RJ & Xiong Y (2013). Signaling pathways that control cell proliferation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5(3): a008904.
- Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology* 35(4): 495-516.
- Fang H & Declerck YA (2013). Targeting the tumor microenvironment: from understanding pathways to effective clinical trials. *Cancer research* 73(16): 4965-4977.
- Feller L, Altini M & Lemmer J (2013). Inflammation in the context of oral cancer. *Oral oncology* 49(9): 887-892.
- Fidler IJ & Nicolson GL (1976). Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines. *Journal of the National Cancer Institute* 57(5): 1199-1202.
- Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J ym. (2015). Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nature cell biology* 17(2): 183-194.
- Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME ym. (1989). Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *International journal of cancer* 43(6): 992-1000.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C & Galon J (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews.Cancer* 12(4): 298-306.
- Friedl P & Alexander S (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 147(5): 992-1009.
- Friedl P & Wolf K (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature reviews.Cancer* 3(5): 362-374.
- Georgakopoulou EA, Achdari MD, Achdari M, Foukas PG & Kotsinas A (2012). Oral lichen planus as a preneoplastic inflammatory model. *Journal of biomedicine & biotechnology*: 759626.
- Grivennikov SI, Greten FR & Karin M (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140(6): 883-899.
- Gross A, McDonnell JM & Korsmeyer SJ (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & development* 13(15): 1899-1911.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hart IR & Fidler IJ (1980). Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer research* 40(7): 2281-2287.
- He KF, Zhang L, Huang CF, Ma SR, Wang YF, Wang WM ym. (2014). CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *BioMed research international*: 838632.

- Hecht I, Bar-El Y, Balmer F, Natan S, Tsarfaty I, Schweitzer F ym. (2015). Tumor invasion optimization by mesenchymal-amoeboid heterogeneity. *Scientific reports* 5: 10622.
- Hensley P, Mishra M & Kyprianou N (2013). Targeting caspases in cancer therapeutics. *Biological chemistry* 394(7): 831-843.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M ym. (2015). Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527(7578): 329-335.
- Irani S (2016). Distant metastasis from oral cancer: A review and molecular biologic aspects. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 6(4): 265-271.
- Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C ym. (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438(7069): 820-827.
- Knudson AG (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature reviews.Cancer* 1(2): 157-162.
- Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV & Perelmuter VM (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. *Acta Naturae* 7(2): 17-28.
- Lien MY, Tsai HC, Chang AC, Tsai MH, Hua CH, Wang SW ym. (2018). Chemokine CCL4 Induces Vascular Endothelial Growth Factor C Expression and Lymphangiogenesis by miR-195-3p in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in immunology* 9: 412.
- Mitra AK, Zillhardt M, Hua Y, Tiwari P, Murmann AE, Peter ME ym. (2012). MicroRNAs reprogram normal fibroblasts into cancer-associated fibroblasts in ovarian cancer. *Cancer discovery* 2(12): 1100-1108.
- Mroueh R, Haapaniemi A, Grenman R, Laranne J, Pukkila M, Almangush A ym. (2017). Improved outcomes with oral tongue squamous cell carcinoma in Finland. *Head & neck* 39(7): 1306-1312.
- Muz B, de la Puente P, Azab F & Azab AK (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)* 3: 83-92.
- Naakka E, Tuomainen K, Wistrand H, Palkama M, Suleymanova I, Al-Samadi A, Salo T (2019). Fully Human Tumor-based Matrix in Three-dimensional Spheroid Invasion Assay
- Ng JH, Iyer NG, Tan MH & Edgren G (2017). Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head & neck* 39(2): 297-304.
- Nguyen DX, Bos PD & Massague J (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nature reviews.Cancer* 9(4): 274-284.
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR ym. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine* 17(11): 1498-1503.

- Niklander J & Paasonen L (2019). Breast Cancer Cell Line MCF7 3D Culture Demonstrated in GrowDex® and Matrigel. (<https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/application-notes/breast-cancer-cell-line-mcf7-3d-culture-demonstrated-in-growdex-and-matrigel/>)
Luettu 27.5.2019
- Olsson M & Zhivotovsky B (2011). Caspases and cancer. *Cell death and differentiation* 18(9): 1441-1449.
- Ozaki T & Nakagawara A (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* 3(1): 994-1013.
- Paget S (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer metastasis reviews* 8(2): 98-101.
- Pandruvada SN, Yuvaraj S, Liu X, Sundaram K, Shanmugarajan S, Ries WL ym. (2010). Role of CXC chemokine ligand 13 in oral squamous cell carcinoma associated osteolysis in athymic mice. *International journal of cancer* 126(10): 2319-2329.
- Pankova K, Rosel D, Novotny M & Brabek J (2010). The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67(1): 63-71.
- Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G ym. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. *Nature reviews.Cancer* 17(5): 302-317.
- Pereira ER, Jones D, Jung K & Padera TP (2015a). The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 38: 98-105.
- Pereira ER, Jones D, Jung K & Padera TP (2015b). The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. *Seminars in cell & developmental biology* 38: 98-105.
- Petruzzi, Maria Noel Marzano Rodrigues, Cherubini K, Salum FG & de Figueiredo M, Antonia Zancanaro (2017). Role of tumour-associated macrophages in oral squamous cells carcinoma progression: an update on current knowledge. *Diagnostic Pathology* 12: 32.
- Pickup MW, Mouw JK & Weaver VM (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO reports* 15(12): 1243-1253.
- Quail DF & Joyce JA (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine* 19(11): 1423-1437.
- Raman D, Baugher PJ, Thu YM & Richmond A (2007). Role of chemokines in tumor growth. *Cancer letters* 256(2): 137-165.
- Rantala J & Paasonen L (2019). Solid tumor derived cell line BT474 and ascites metastasis derived cell line COLO205 cultures in GrowDex. <https://www.upmbiomedicals.com/resource-center/application-notes/solid-tumor-derived-cell-line-bt474-and-ascites-metastasis-derived-cell-line-colo205-cultures-in-growdex/>
Luettu 27.5.2019

- Rupprecht TA, Plate A, Adam M, Wick M, Kastenbauer S, Schmidt C ym. (2009). The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *Journal of neuroinflammation* 6: 42.
- Salo S, Bitu C, Merkku K, Nyberg P, Bello IO, Vuoristo J ym. (2013). Human bone marrow mesenchymal stem cells induce collagen production and tongue cancer invasion. *PloS one* 8(10): e77692.
- Salo T, Sutinen M, Hoque Apu E, Sundquist E, Cervigne NK, de Oliveira CE ym. (2015). A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC cancer* 15: z.
- Salo T, Vered M, Bello IO, Nyberg P, Bitu CC, Zlotogorski Hurvitz A ym. (2014). Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. *Experimental cell research* 325(2): 58-64.
- Sankaranarayanan R, Ramadas K, Thara S, Muwonge R, Thomas G, Anju G ym. (2013). Long term effect of visual screening on oral cancer incidence and mortality in a randomized trial in Kerala, India. *Oral oncology* 49(4): 314-321.
- Sarvaiya PJ, Guo D, Ulasov I, Gabikian P & Lesniak MS (2013). Chemokines in tumor progression and metastasis. *Oncotarget* 4(12): 2171-2185.
- Shang ZJ, Liu K & Shao Z (2009). Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 45(6): 480-485.
- Sherr CJ (1996). Cancer cell cycles. *Science (New York, N.Y.)* 274(5293): 1672-1677.
- Shiga K, Hara M, Nagasaki T, Sato T, Takahashi H & Takeyama H (2015). Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. *Cancers* 7(4): 2443-2458.
- Sica A, Schioppa T, Mantovani A & Allavena P (2006). Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer* 42(6): 717-727.
- Specenier P (2018). Nivolumab in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert review of anticancer therapy* 18(5): 409-420.
- Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB & Achen MG (2014). Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nature reviews.Cancer* 14(3): 159-172.
- Suusyöpä. Käypä hoito -suositus. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Hammaslääkäriseura Apollonian asettama työryhmä. Helsinki: Suomalainen Lääkäriseura Duodecim, 2019 (Luettu 16.01.2020).
- Takebayashi S, Hickson A, Ogawa T, Jung K, Mineta H, Ueda Y ym. (2004). Loss of chromosome arm 18q with tumor progression in head and neck squamous cancer. *Genes, chromosomes & cancer* 41(2): 145.
- Thiery JP (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews.Cancer* 2(6): 442-454.

- Thomas S, Balan A & Balaram P (2015). The expression of retinoblastoma tumor suppressor protein in oral cancers and precancers: A clinicopathological study. *Dental research journal* 12(4): 307-314.
- Thomson PJ (2018). Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention-proliferation, position, progression and prediction. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*.
- Thomson PJ, Potten CS & Appleton DR (1999). Mapping dynamic epithelial cell proliferative activity within the oral cavity of man: a new insight into carcinogenesis? *The British journal of oral & maxillofacial surgery* 37(5): 377-383.
- Tuomainen, K.; Al-Samadi, A.; Potdar, S.; Turunen, L.; Turunen, M.; Karhemo, P.-R.; Bergman, P.; Risteli, M.; Åström, P.; Tiikkaja, R.; Grenman, R.; Wennerberg, K.; Monni, O.; Salo, T. Human Tumor-Derived Matrix Improves the Predictability of Head and Neck Cancer Drug Testing. *Cancers* 2019, 12, 92.
- UPM Biomedicals (2019). <https://www.upmbiomedicals.com/for-life-science/growdex/> Luettu 27.5.2019
- van Zijl F, Krupitza G & Mikulits W (2011). Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation research* 728(1-2): 23-34.
- Vered M, Schiby G, Schnaiderman-Shapiro A, Novikov I, Bello IO, Salo T ym. (2014). Key architectural changes in tumor-negative lymph nodes from metastatic-free oral cancer patients are valuable prognostic factors. *Clinical & experimental metastasis* 31(3): 327-338.
- Wang B, Zhang S, Yue K & Wang XD (2013). The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chinese Journal of Cancer* 32(11): 614-618.
- Warnakulasuriya S, Johnson NW & van der Waal I (2007). Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 36(10): 575-580.
- Weber GF (2008). Molecular mechanisms of metastasis. *Cancer letters* 270(2): 181-190.
- Weinberg RA (1995) The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell*, 81, 323-330
- Willard-Mack CL (2006). Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicologic pathology* 34(5): 409-424.
- Wong RS (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 30: 87.
- Yaacoub K, Pedoux R, Tarte K & Guillaudeux T (2016). Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer letters* 378(2): 150-159.
- Yamaguchi H & Condeelis J (2007). Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochimica et biophysica acta* 1773(5): 642-652.

Zhuang Z, Jian P, Longjiang L, Bo H & Wenlin X (2010). Altered phenotype of lymphatic endothelial cells induced by highly metastatic OTSCC cells contributed to the lymphatic metastasis of OTSCC cells. *Cancer science* 101(3): 686-692.